Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Einundfünfzigster Band.

1913.



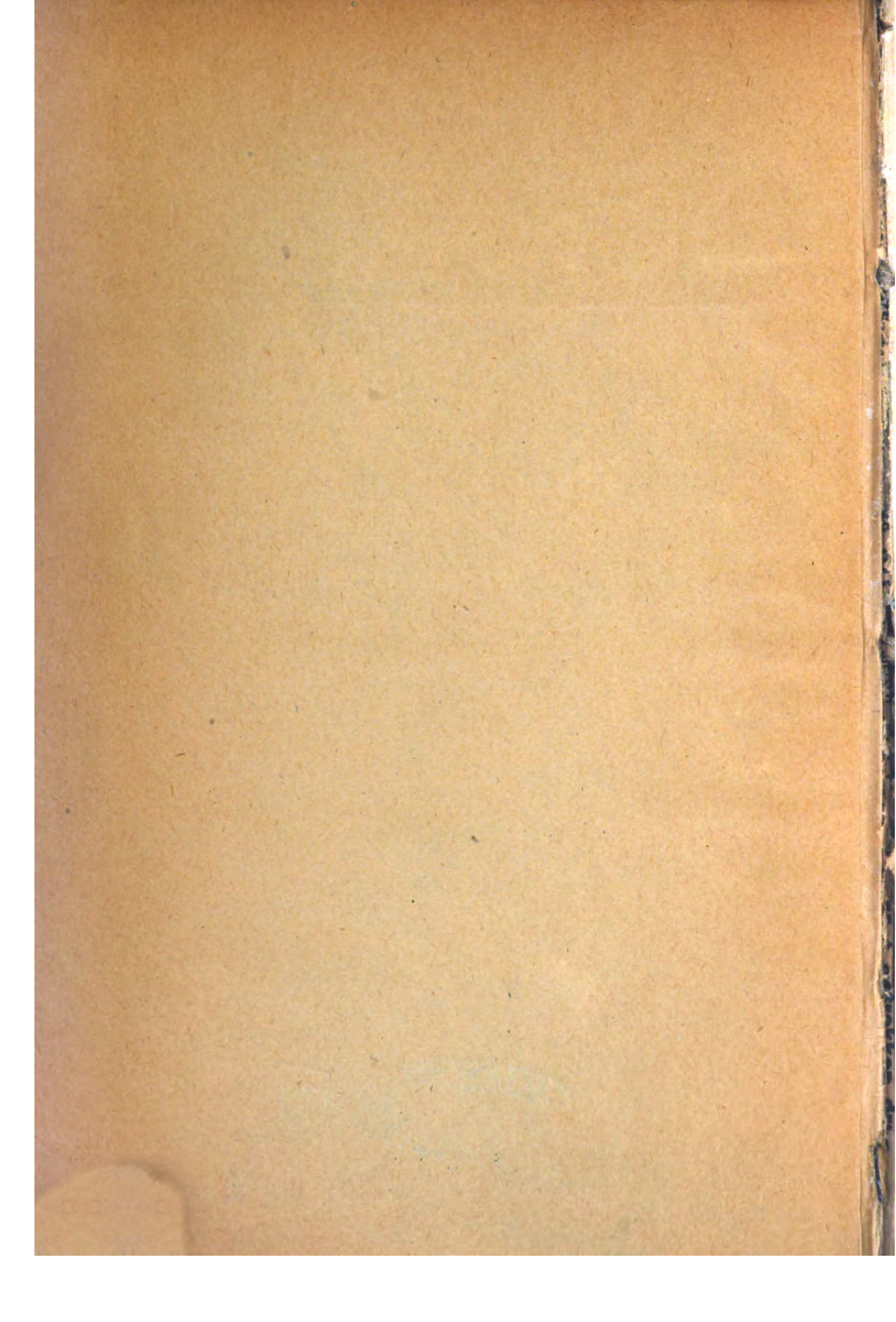
Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1913.




F.G. KOSTER BOEKBINDER


LEESMUSEUM
AMSTERDAM.


M



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

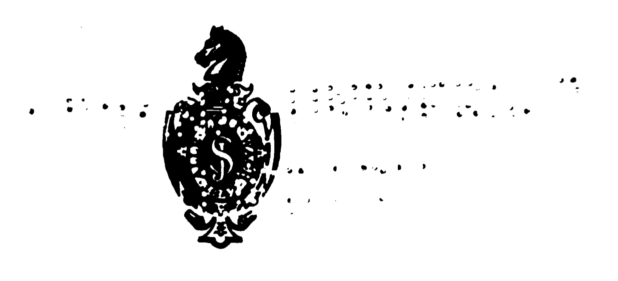
E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

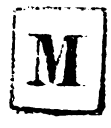
C. Neuberg-Berlin.

Einundfünfzigster Band



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1913.





Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Die Rolle der Oberflächenspannung und der Lipoide für die lebenden Zellen.

Von

H. M. Vernon.

(Aus dem Physiologischen Laboratorium der Universität Oxford.)

(Eingegangen am 25. März 1913.)

Mit 8 Figuren im Text.

Fernbach[1]) hat nachgewiesen, daß durch Immersion von lebenden Hefezellen in verdünnten Alkohol eine Exosmose der Invertase hervorgerufen wird; eine ähnliche Exosmose ist von O'Sullivan[2]) mit Äther beobachtet worden. In letzter Zeit hat Czapek[3]) in einer großen Reihe von Versuchen mit einer Anzahl von Alkoholen, Ketonen, Estern und anderen organischen Stoffen die niedrigsten Konzentrationen bestimmt, bei denen zuerst Exosmose von Tannin aus Zellen, namentlich aus mesophyllhaltigen, verschiedener Spezies Echeveria auftritt. Er fand, mit einigen Ausnahmen, daß die exosmotischen Stoffe bei Berührung mit Luft eine Oberflächenspannung von 0,685 haben, die Wasser-Luft-Oberflächenspannung als Einheit angenommen. Dieser Forscher behauptet, daß die Oberflächentension dieser Lösungen gegenüber der obersten Schicht oder Plasmahaut der in sie eingetauchten Pflanzenzellen sich parallel ihrer Spannung gegen Luft verhält. In diesem Verhältnis glaubt er nun, ein brauchbares Maß für die Oberflächenspannung der Plasmahaut von lebenden Pflanzenzellen gewonnen zu haben. Soweit ich es

---

1) Fernbach, Annales de l'Inst. Pasteur 4, 641, 1890.

2) O'Sullivan, Trans. Chem. Soc. 61, 935, 1892.

3) Czapek, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 28, 159 u. 480. 1910. — Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jena 1911.

beurteilen kann, entbehrt die Behauptung Czapeks, daß die Plasmahautspannung gegenüber Flüssigkeiten mit der Wasser-Luftspannung übereinstimmt, des durch das Experiment gestützten Beweises. Sie steht in direktem Widerspruch zu einem der von Clerk-Maxwell vor ca. 40 Jahren aufgestellten Gesetze der Oberflächenspannung. Dieses besagt, daß „die Spannung der trennenden Oberfläche von zwei sich nicht mischenden Flüssigkeiten nach keiner uns bekannten Methode aus den Oberflächentensionen der Lösungen, wenn sie einzeln mit Luft in Berührung stehen, bestimmt werden kann". Jedenfalls fallen einige von Czapek selbst ermittelten Resultate eklatant aus seiner Theorie der Konstanz von der Oberflächenspannung der Exosmose bewirkenden Flüssigkeiten heraus, so daß sie eher die Czapeksche Hypothese stürzen als befestigen. Zweifellos ist die Oberflächenspannung ein bedeutender Faktor in lebenden Zellen[1]. Indes beruht die Exosmosewirkung der meisten organischen Substanzen, die Czapek untersucht hat, wohl auf ihrer Auflösung in den Lipoidbestandteilen der Plasmahaut, eine Erscheinung, die sich aus dem bekannten Meyer-Overtonschen Gesetz der Teilungskoeffizienten glatt erklärt.

Die Abhängigkeit der Exosmose von Lipoiden.

In der nachstehenden Tabelle sind alle von Czapek mit löslichen organischen Substanzen erzielten Ergebnisse zusammengestellt. In Spalte 2 steht die Wasser-Luft-Oberflächenspannung jeder Substanz in verdünntestem Zustande, die Exosmose bei Echeveria hervorgerufen hat. In einigen Fällen konnte die Konzentration nicht genau festgestellt werden, aber die vorliegenden Daten zeigen, daß in bezug auf die einwertigen Alkohole, die Ketone, Ester und Äther, Czapek mit Recht die Oberflächenspannung der exosmotisch wirkenden Lösungen als ziemlich konstant hinstellt. Der untere Abschnitt der Tabelle enthält die Ausnahmen — wir sehen, nicht weniger als 7 der 29 geprüften Stoffe können überhaupt nicht für die Richtigkeit der Czapekschen Hypothese in Betracht gezogen werden.

---

[1] Macallum, Ergebn. d. Physiol. **11**, 598, 1911. — Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 541, 1904; **123**, 419, 1908; **140**, 109, 1911.

Tabelle I.

Substanz	Oberflächenspannung d. Exosmose bewirkenden Lösung	Konzentration g-mol	Narkotisierende Konzentr. f. Kaulquappen	Exosmosekonz. / Narkosekonz.
Methylalkohol	0,71—0,73	3,81 m	0,57 m	6,7
Äthylalkohol	0,66—0,68	1,88	0,29	6,5
Normalpropylalkohol .	0,66—0,71	0,604	0,11	5,5
Isopropylalkohol . . .	0,68—0,70	0,593	0,13	4,6
Tertiärer Butylalkohol .	0,61—0,67	0,376	0,13	2,9
Sekundär. Butylalkohol	0,64	0,254	—	—
Normalbutylalkohol . .	0,63—0,74	0,164	0,038	4,3
Isobutylalkohol	0,64—0,69	0,163	0,045	3,6
Tertiärer Amylalkohol .	0,66	0,146	0,057	2,6
Sekundär. Amylalkohol	0,65	0,091	—	—
Isoamylalkohol	0,66—0,69	0,051	0,023	2,2
Allylalkohol	0,68—0,71	0,65	0,13	5,0
Äthyläther	0,61—0,71	0,316	0,07	4,5
Aceton	0,68—0,72	1,51	0,26	5,8
Methyläthylketon . . .	0,67—0,70	0,50	0,09	5,6
Methylpropylketon . .	0,67—0,76	0,14	0,019	7,4
Äthylformiat	0,69	0,49	0,08	6,1
Äthylacetat	0,69	0,30	0,03	10,0
Methylacetat	0,76	0,50	0,08	6,3
Äthylurethan	0,70	0,90	0,041	22,0
Glycerin-Diacetat . . .	0,66—0,67	0,54	0,015	36,0
Glycerin-Triacetat . .	0,64—0,71	0,159	0,009	17,7
Acetonitril	0,82	1,15	0,36	3,2
Nitromethan	0,90	0,56	0,082	6,8
Äthylenglykol	0,90—0,94	2,13	0,46	4,6
Glycerin	0,98?	3,09	—	—
Chloralhydrat	0,94	0,182	0,02	9,1
Phenol	0,98?	0,0625	$>$0,0053	$<$11,8
Chloroform	0,998?	(0,0076)	0,0012	6,3

Chloroform bildet von allen die bemerkenswerteste Ausnahme, denn eine gesättigte Lösung hat eine Oberflächenspannung von 0,98, und unten angeführte Resultate ergeben, daß Exosmose wahrscheinlich durch eine $^1/_9$ gesättigte Lösung bedingt wird.

In der 3. Spalte der Tabelle finden wir die Konzentrationen der Exosmose bewirkenden Lösungen in Gramm-Molekülen nach Czapeks Angaben, dann folgen die narkotisierenden Werte derselben Substanzen für Kaulquappen. Diese Zahlen sind von Overton[1]) festgestellt worden, außer für Glycerindiacetat und

[1]) Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

Chloralhydrat, die nach Baum[1]) ermittelt sind, und für Allylalkohol, die ich selbst berechnet habe. Das Verhältnis zwischen Exosmose- und Narkosewert ist in der letzten Kolumne aufgeführt, und bei den Alkoholen anfangend, sehen wir, daß es keineswegs konstant ist. Mit zunehmendem Molekulargewicht schrumpft es von einem Maximum 6,7 für Methyalkohol zu einem Minimum von 2,2 für Isoamylalkohol ein. Daraus könnte man folgern, daß Exosmosekonzentrationen in gar keiner engen Beziehung zu den Narkosewerten stehen. Ein Vergleich mit anderen Reihen von Narkosezahlen zeigt aber, daß ein solcher Schluß falsch ist. Aus der nächsten Tabelle, die die Quotienten von den Echeveriawerten und eben diesen anderen narkotischen Grenzkonzentrationen gibt, sehen wir, daß manchmal das Verhältnis beim Aufsteigen von den niedrigeren zu den höheren Alkoholen zunimmt, anstatt abzunehmen.

Tabelle II.

Alkohol	Verhältnis der Echeveriakonz. zur Narkosekonz.				
	Kaninchen (Joffroy)	Phoxinus (Fühner)	Schildkrötenherzen (Vernon)	Kaulquappen (Overton)	Bakterien (Wirgin)
Methylalkohol . .	3,0	6,5	3,6	6,7	1,61
Äthylalkohol . . .	4,6	7,5	3,5	6,5	1,49
Normalpropylalkoh.	6,7	9,2	3,2	5,5	1,00
Isopropylalkohol .	—	—	2,5	4,6	0,99
Tertiär. Butylalkoh.	—	—	2,6	2,9	0,62
Normal. Butylalkoh.	—	9,6	4,0	4,3	0,55
Isobutylalkohol . .	5,3	—	3,4	3,6	0,55
Tertiär. Amylalkoh.	—	—	2,1	2,6	0,40
Isoamylalkohol . .	5,1	9,3	3,0	2,2	0,50

So ist die auf Echeveria einwirkende Methylalkoholkonzentration dreimal so stark wie die von Joffroy und Serveaux[2]) ermittelte mit narkotischer Wirkung für Kaninchen, während sie bei den höheren Alkoholen das vier- bis sechsfache der Narkosekonzentration betrug. Die Ellritze (Phoxinus) lieferte Fühner[3]) eine ähnliche, wenn auch regelmäßigere Reihe ansteigender Werte, doch die von mir[4]) selbst an Schildkröten-

[1]) Baum, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 42, 119, 1899.
[2]) Joffroy und Serveaux, Arch. de méd. exp. et d'anat. path. 1895.
[3]) Fühner, Zeitschr. f. Biol. 57, 465, 1912.
[4]) Vernon, Journ. of Physiol. 43, 325, 1911.

herzen ermittelten Zahlen (d. h. die zur Erniedrigung der Herzschläge um 50 % nötigen Konzentrationen) weisen durchweg eine, wenn auch nicht vollkommene Konstanz auf. Andererseits wurden bei Bakterien[1]) viel rapider abnehmende Werte erzielt als bei Kaulquappen. So war die auf Echeveria einwirkende Konzentration von Methylalkohol $1^1/_2$ mal so groß wie diejenige, die zur Entwicklungshemmung von M. pyogenes aureus nötig ist, während die von tertiärem Amylalkohol nur $^2/_5$ mal so stark war.

Weitere Forschungen auf diesem Arbeitsfelde werden wahrscheinlich ergeben, daß diese großen Abweichungen in den bei verschiedenen Organismen beobachteten Werten nicht zufällige sind, sondern einem bestimmten Gesetze folgen. Fühner, der die narkotisierenden Werte von Äthyl- und Heptylalkohol an einem umfangreichen Tiermaterial bestimmt hat, konnte eine ziemlich regelmäßige Abstufung in ihrer relativen Einwirkungskraft konstatieren, die mit der Entwicklung von den niederen zu den höheren Tieren einhergeht. Von Äthylalkohol war fast dieselbe Konzentration für alle Tiere erforderlich, doch während die zum Narkotisieren der niederen Wirbellosen nötige Konzentration des Heptylalkohols ungefähr 400 mal kleiner als die des Äthylalkohols war, betrug sie bei Fischen und Amphibien etwa $^1/_{1000}$ davon. Diese Resultate, zusammen mit dem Umstande, daß Bakterien relativ den höheren Alkoholen gegenüber weniger empfindlich sind als irgendein bisher untersuchtes organisches Wesen, führen zur Vermutung, daß die Reaktion einfach von der Kompliziertheit und Entwicklungsstufe des Organismus abhängt. Doch zeigen die vor kurzem veröffentlichten Versuche von Helene Nothmann-Zuckerkandl[2]) über Alkoholkonzentrationen, die Protoplasmaströmung in Pflanzenzellen hemmen, daß diese Annahme nicht richtig ist. Die Konzentrationen von Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butyl- und Isoamylalkohol, die Hemmung der Strömung in den Blattzellen von Vallisneria in 3 bis 7 Stunden bewirkten, waren 2,6, 2,7, 3,6, 2,9 und 3,0 mal größer als die entsprechenden Narkosewerte für Kaulquappen, d. h. wir haben eine Reihe von konstanten Werten vor uns, anstatt einer rapide abnehmenden, wie dies bei Eche-

---

[1]) Wirgin, Zeitschr. f. Hygiene 46, 149, 1904.

[2]) H. Nothmann-Zuckerkandl, diese Zeitschr. 45, 412, 1912.

veria der Fall war. Folglich sind, worauf Nothmann-Zuckerkandl verweist, die Wasser-Luft-Oberflächenspannungen der Alkohole, die die Plasmaströmung lähmen, nicht konstant, sondern sie sinken beständig von 0,88 für Methylalkohol auf 0,62 für Isoamylalkohol.

Es fehlt uns vorläufig eine Erklärung für diese auffallende Divergenz. Vielleicht kann sie auf Unterschiede in der chemischen Konstitution der Lipoide der verschiedenen Organismen zurückgeführt werden. Daß es ganz erhebliche Differenzen in dieser Beziehung gibt, steht außer allem Zweifel fest, und ebenso kann das relative Lösungsvermögen für verschiedene Alkohole und andere organische Substanzen variieren.

Um auf die Erörterung der ersten Tabelle zurückzukommen, so sehen wir, daß das Verhältnis des Echeveriawertes zum Narkosewert für Allylalkohol, Äther und die drei Ketone ziemlich konstant war, daß aber drei der sechs Ester abnorme Quotienten geliefert haben. Die Äthylurethanzahl beruht wahrscheinlich auf einer spezifischen Empfindlichkeit der Kaulquappen diesem Narkoticum gegenüber. Sein narkotischer Grenzwert liegt bei 0,041 m, der von Overton für Methylurethan gefundene bei 0,27 m. In der Regel ist die narkotisierende Konzentration einer Äthylverbindung 2 bis 3 mal kleiner als die einer Methylverbindung. Außerdem haben Fühner und Neubauer[1]) gefunden, daß die Konzentration, die in roten Blutkörperchen Hämolyse hervorruft, 2,3 mal geringer als diejenige von Methylurethan ist. Der narkotische Grenzwert von Äthylurethan für Kaulquappen sollte demnach bei 0,117 m liegen und das fast normale Verhältnis 7,7 liefern.

Wahrscheinlich geben alle diejenigen Substanzen, die mit der Czapekschen Theorie der Oberflächentension nicht im Einklang stehen, ziemlich annehmbare Werte. Overton beobachtete, daß Kaulquappen innerhalb 2 Stunden durch 0,0053 m-Phenol nicht gelähmt wurden; noch höhere Konzentrationen hat er nicht ausprobiert. Obgleich Äthylglykol nicht als wahres Narkoticum anzusprechen ist, hat es in der auf Tabelle I angegebenen Konzentration Kaulquappen in 12 bis 20 Stunden getötet. Glycerin versagte völlig als narkotisierendes Agens

[1]) Fühner und Neubauer, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 333, 1907.

bei derselben Tierspezies. Czapek hat die auf Echeveriablätter einwirkende Chloroformkonzentration nicht ermittelt, jedoch zeigen die Stärkegrade der Alkohole, Ester, Ketone und anderer Substanzen, die nach den Untersuchungen von Nothmann-Zuckerkandl in 3 bis 7 Stunden die Protoplasmaströmung zum Stillstand bringen, zum größten Teile eine weitgehende Übereinstimmung mit den Echeveriawerten, von der sich wohl das Chloroform nicht ausschließen wird. Die Strömung wurde durch eine $^1/_9$ gesättigte Chloroformlösung gehemmt, das ist, nach eigenen Untersuchungen über die Löslichkeit von Chloroform in Salzlösung, eine Lösung von 0,0076 m.

Betrachten wir nun die Ergebnisse als Ganzes, so sehen wir, daß 20 von den 26 ermittelten Verhältniszahlen zwischen den Grenzen 2,2 und 7,4 schwankten, während nur 2 der restierenden 6 Zahlen, diejenigen der Glycerinacetate, ganz abnorme und unverständliche Resultate lieferten. Wenn man bedenkt, daß Czapek in einigen seiner Echeveriaversuche die Wirkungsstärke nur grob feststellte (so wird dieselbe z. B. von mehreren Substanzen als zwischen 1 und $2^0/_0$ liegend angegeben), so kann man nicht umhin, eine viel größere Analogie zwischen den zur Exosmose und Narkose derselben Substanzen nötigen Konzentrationen zu konstatieren, als zwischen ersteren und den Oberflächenspannungswerten.

Die Funktion der Lipoide in tierischen Zellen.

Der Umstand, daß unter gewissen Bedingungen Zellbestandteile, wie Tannin und Invertase, sich in pflanzlichen Zellen exosmotisch verhalten, deutet darauf hin, daß im normalen Zustande mechanische Vorrichtungen bestehen, die den Austritt der Inhaltsstoffe aus den Zellgrenzen verhindern. Dieser Mechanismus scheint eine Plasmahaut lipoider Natur zu sein. Man kann wohl annehmen, daß auch tierische Zellen mit einer ähnlichen Schutzvorrichtung ausgestattet sind, denn obgleich die unten beschriebenen Versuche das Vorhandensein einer solchen äußeren Grenzschicht nicht strikt beweisen, so geht doch aus ihnen hervor, daß die Zellstoffe — oder wenigstens einige davon — durch Lipoide zusammengehalten werden. Die nahe Beziehung meiner experimentell gewonnenen Zahlenergebnisse zu den Czapekschen Exosmosewerten einerseits und den Nar-

kosezahlen andererseits spricht deutlich dafür, daß die angewandte Versuchsmethode bei tierischen Zellen zu denselben Resultaten führt wie die Exosmosemethode bei pflanzlichen.

Unsere Versuchsanordnung basiert auf der Tatsache, daß dieselben Substanzen, die in einer bestimmten Konzentration in Pflanzenzellen Exosmose hervorrufen, ebenso, wenn auch etwas stärker konzentriert, auf ein in der Tierzelle vorhandenes Enzym, die Indophenoloxydase, zerstörend einwirken. Wie ich an anderer Stelle[1]) bereits dargetan habe, ist diese Oxydase ein unlösliches Enzym, dessen Aktivität von der Gegenwart der Lipoidzellbestandteile abhängig zu sein scheint. So verliert fein zerhackte Niere eines Säugetieres oder anderes Gewebe nach $^1/_2$ stündiger Behandlung mit zweckmäßig gewählten Konzentrationen von Alkoholen, Ketonen und anderen Stoffen nicht im geringsten das Vermögen, eine Mischung von α-Naphthol- und Paraphenylendiamin zu Purpurindophenolblau zu oxydieren. Eine doppelt so starke Konzentration dieser Substanzen kann dagegen gänzlich die Aktivität dieses Fermentes zerstören. Die angewandte Methode zur quantitativen Bestimmung der Oxydase ist früher[2]) ausführlich von mir beschrieben worden. Die Narkotica wirkten immer $^1/_2$ Stunde bei ungefähr 17° auf die Oxydase ein, und diese Zeit genügt vollauf, wie bewiesen werden sollte, damit ein endgültiger und scharf begrenzter Effekt zum Ausdruck kommt. Bei Czapeks Versuchen erstreckt sich die Einwirkung auf die Pflanzenzellen auf mehrere Stunden. In Fig. 1 sind die Wirkungen veranschaulicht, die verschiedene Konzen-

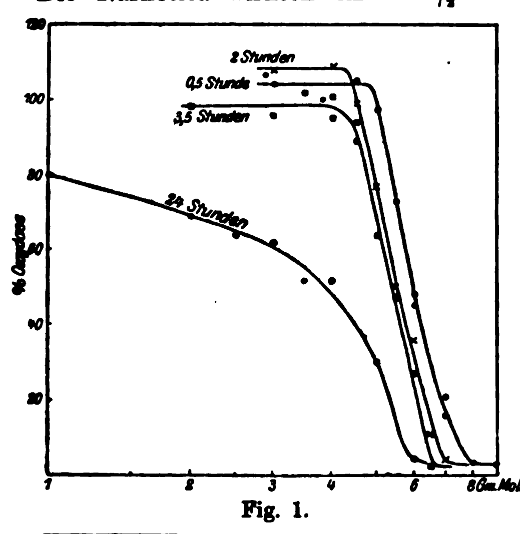


Fig. 1.

[1]) Vernon, Journ. of Physiol. 44, 150, 1912; 45, 197, 1912. — Diese Zeitschr. 47, 374, 1912.

[2]) Vernon, Journ. of Physiol. 42, 402, 1911; 43, 96, 1911.

trationen von Äthylalkohol in einer Einwirkungszeit von $^1/_2$, 2, $3^1/_2$ und 24 Stunden ausgelöst haben. In dieser und den folgenden Figuren stellt die Ordinate das prozentische Verhältnis des Oxydasengehaltes in dem Nierengewebe zu dem in den Kontrollproben dar, in denen die Niere mit Ringerscher Lösung ohne narkotischen Zusatz behandelt wurde. Angesetzt wurden jedesmal 2 Kontrollproben und von den damit vorgenommenen Bestimmungen die Mitte genommen. Die Abszisse verbildlicht die Narkoticumkonzentration in Grammolekülen. Die Werte sind logarithmisch eingetragen, so daß die Verdoppelung oder Halbierung der Konzentration immer durch gleiche Entfernung bezeichnet wird.

Diese Kurven zeigen, daß $^1/_2$stündige Behandlung der Niere ein ebenso scharf ausgeprägtes Resultat zeitigte wie eine 2stündige, obgleich die zuerst auf die Oxydase einwirkende Konzentration um etwas erhöht war (4,8 m gegen 4,5 m). Eine $3^1/_2$stündige Behandlung ist offenbar zu lang, da nachher kein so präzis definierter Einwirkungspunkt auftritt und in einem so langen Zeitraum sogar die niedrigsten geprüften Alkoholkonzentrationen wahrscheinlich einen geringen schädlichen Einfluß auf die Oxydase ausübten. Andererseits konnte beobachtet werden, daß dieses und die meisten anderen Narkotica nach Einwirkung von 2 Stunden oder weniger die Oxydationskraft des Gewebes erhöhten. Behandlung der Organe 24 Stunden lang ist ganz zwecklos, da durch alle Konzentrationen von Alkohol in dieser Zeit eine partielle Lähmung der Oxydase bewirkt und der Prozeß der allmählichen Abtötung verwischt wird. Die in Fig. 2 ausgezogenen Kurven für Isoamylalkohol entsprechen in ihrem Verlauf denen für Äthylalkohol. Sie fallen nicht so steil ab, doch es erhellt zur Genüge, daß die Nierenbehandlung nach 2 Stunden im wesentlichen dasselbe Ergebnis geliefert hat wie schon nach $^1/_2$ Stunde, während die

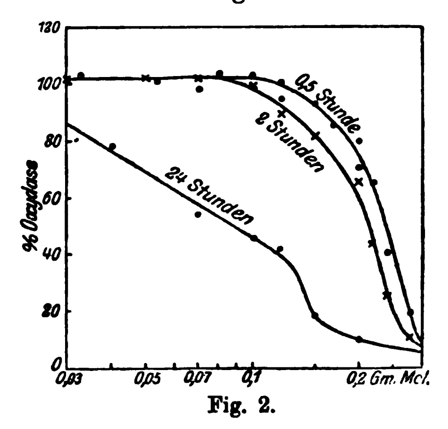


Fig. 2.

24 stündige Einwirkung eine wert- und interesselose Figur ergibt.

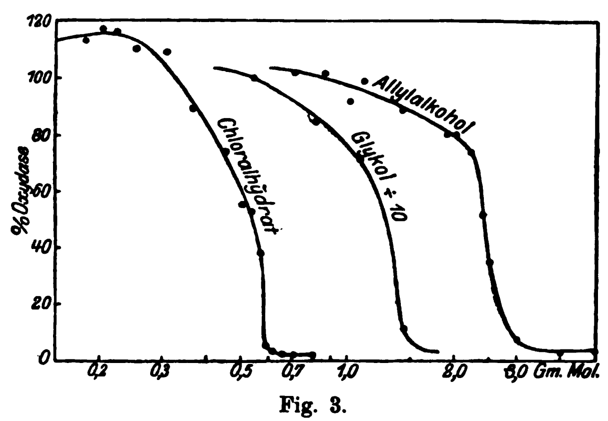


Fig. 3.

In Fig. 3 sehen wir die mit Chloralhydrat, Äthylenglykol und Allylalkohol gewonnenen Ergebnisse graphisch dargestellt. Chloralhydrat lieferte ein scharf eindeutiges Resultat, das insofern bedeutend ist, als es zeigt, daß schon schwache Konzentrationen die Oxydationskraft der Gewebe um 15 % erhöhten. Glykol entfaltet erst in hohen Stärkegraden eine Wirkung. Die damit erzielten Werte sind, um die Darstellung in der Figur nicht zu erschweren, durch 10 dividiert worden. Die Allylalkoholkurve hat ein ziemlich abnormes Aussehen. Die Fermentzerstörung setzt erst allmählich bei Konzentrationen von 0,7 m bis 2,2 m ein und geht dann plötzlich rapide in die Höhe.

Die Resultate, die in den Untersuchungen mit Methyl-, Propyl- und Butylalkohol, 3 Ketonen, Äther, Chloroform, Urethan, Phenol und anderen Substanzen gewonnen wurden, sind bereits veröffentlicht worden[1]). Alle diese Substanzen, außer Chloroform, gaben Kurven mit scharfem Profil. Die Chloroformkurve ähnelte etwas der Allylalkoholkurve. In weiterer Ergänzung hierzu wurden noch Versuche mit den Äthylestern der Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure ausgeführt. Äthylformiat lieferte einen absolut aus der Reihe fallenden Wert, während die Ergebnisse von Äthylacetat sehr ungleichmäßig, meist normwidrig waren. Eine Erklärung hierfür gibt die Tat-

---

[1]) Vernon, l. c.

sache, daß das Nierengewebe eine Lipase enthält, welche die Ester, namentlich Äthylformiat, ziemlich schnell hydrolysiert. Die dadurch in Freiheit gesetzten Säuren vernichten dann die Oxydase mit größerer Gewalt, als es die Ester selbst imstande sind. Äthylpropionat und Butyrat und auch Propylacetat lieferten fast normale Werte, doch da Czapek diese Ester nicht berücksichtigt hat, ist ein Vergleich unmöglich.

Die Versuchsergebnisse mit Nitromethan und Acetonitril (Methylcyanid) veranschaulicht Fig. 4. Beide Substanzen haben unter normalen Verhältnissen einen erstaunlich ausgedehnten Wirkungsumfang in ihrem Effekt auf die Oxydase. Nitromethan setzte mit seiner Wirkung bei einer unterhalb 0,0015 m liegenden Konzentration ein, bei einer solchen von 0,008 m bis 0,8 m erfolgte Zerstörung einer ziemlich konstanten Oxydasemenge (ca. 40 %). Bei ansteigenden Stärkegraden fiel das Enzym in rapidem Tempo auf Null herab. Ein ganz ähnliches Ergebnis wurde mit Acetonitril konstatiert. Allem Anschein nach gehen diese beiden Stoffe eine Art Verbindung mit dem Nierengewebe ein, so daß sie nicht wie die anderen Narkotica durch Auswaschen aus demselben entfernt werden. Gestützt wird diese

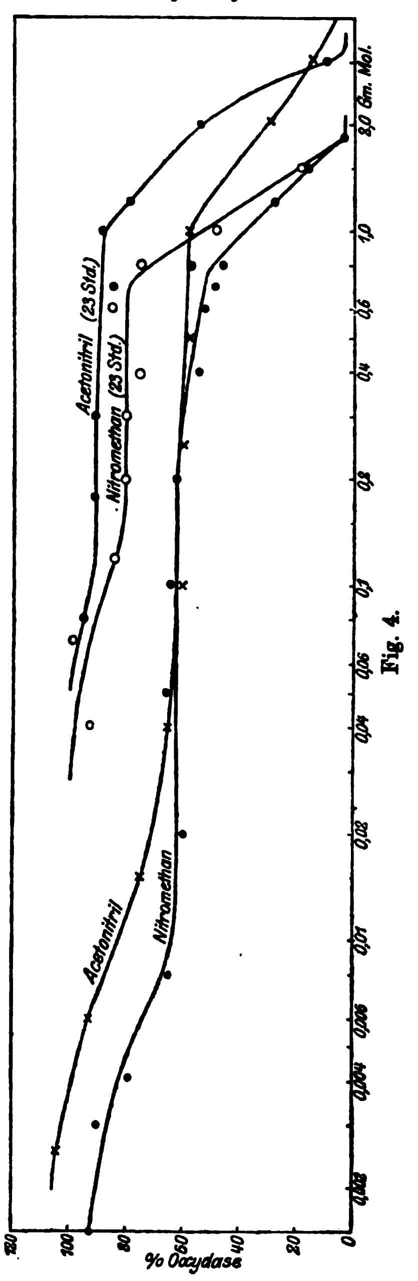


Fig. 4.

Annahme durch die wesentlich abweichenden Resultate, die nach wiederholten und lang andauernden Auswaschungen des Gewebes auftraten. So wurde in einigen Versuchsserien die zerhackte Niere nach der ersten Ausspülung eine Stunde lang in 100 ccm Salzlösung belassen, die nach öfterem Rühren abgegossen und durch neue 100 ccm ersetzt wurde. Dieselbe Prozedur wiederholte sich 5 Stunden später. Am nächsten Tage, d. h. 23 Stunden nach der ursprünglichen Auswaschung, wurde die Salzlösung entfernt und dann die Oxydationskraft des Gewebes bestimmt. Das gleiche Verfahren wurde an unvergifteten Nierenproben, die zur Kontrolle dienten, vorgenommen und ermittelt, daß 10 $^0/_0$ der anfänglichen oxydierenden Kraft dabei verloren gegangen waren. Die Kurven der ausgewaschenen Niere zeigen, daß Konzentrationen von Nitromethan im Bereich von 0,12 m bis 0,7 m etwa 20 $^0/_0$ der Oxydase zerstörten, wonach bei erhöhtem Konzentrationsgrad der Angriff plötzlich heftiger und radikaler wird. Analog hierzu wurden 10 $^0/_0$ der Oxydase durch Acetonitrillösungen mit einem Gehalt von 0,18 m bis 1,0 m gelähmt, und auch hier setzte dann jäh die verstärkte Oxydationshemmung ein. Aus diesen Daten läßt sich wohl mit Recht schließen, daß die Konzentrationen von Nitromethan und Acetonitril, die eben auf die Nierenoxydase schädlich einwirken, 0,7 m, bzw. 1,0 m sind. Die geringe Einwirkung auf das Enzym durch niedrigere Konzentrationen hat wahrscheinlich seinen Grund darin, daß die beiden Gifte trotz Auswaschens im Gewebe zurückgehalten werden. Die Art und Weise, wie die retinierten toxischen Stoffe die Oxydationskraft der Gewebe paralysieren, ist uns vorläufig unbekannt. Doch können wir uns von der Tatsache empirisch überzeugen, indem wir eine ganz geringe Menge Nitromethan der Niere zusetzen, die schon mit dem Naphthol + Diaminreagens vermischt war — wir beobachten dann eine plötzliche Sistierung oder völlige Paralyse der Oxydation. So reduzierte eine 0,015 m Nitromethanlösung die Oxydationskraft um 29 $^0/_0$, 0,6 m Nitromethan hob sie ganz auf.

Die Konzentrationen der verschiedenen Narkotica, die eine Anfangswirkung auf die Nierenoxydase ausübten, sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle III.

Substanz	Auf die Oxydase eben einwirkende Konzentration	Oxydasekonzentr. / Exosmosekonzentr.	Oxydasekonzentr. / Narkosekonzentr.
Methylalkohol . . .	m-10,5	2,8	18
Äthylalkohol	4,8	2,6	17
Normalpropylalkohol	1,5	2,5	14
Normalbutylalkohol .	0,32	2,0	8
Isoamylalkohol . . .	0,12	2,4	5
Allylalkohol	0,85	1,2	7
Äthyläther	0,5	1,6	7
Aceton	4,0	2,6	15
Methyläthylketon . .	0,9	1,8	10
Methylpropylketon .	0,32	2,3	17
Äthylurethan	1,1	1,2	27
Acetonitril	1,0	0,9	8
Nitromethan	0,7	1,3	9
Äthylenglykol . . .	5,4	2,6	12
Chloralhydrat . . .	0,32	1,8	16
Phenol	0,067	1,1	13
Chloroform	0,0145	1,9	12

Die Quotienten aus diesen Zahlen und den Exosmosewerten bei Echeveria bewegen sich in den Grenzen zwischen 0,9 und 2,8. Wenn man in Betracht zieht, daß die Konzentrationen dieser die Oxydase angreifenden Substanzen ein Zahlengebiet von 1 bis 720 umfassen, so ist diese enge Beziehung zu den Echeveriawerten recht bemerkenswert. Im Durchschnitt sind die Oxydasezahlen 1,9 mal größer als die Echeveriawerte, dies Verhältnis ist jedoch nicht für alle pflanzlichen Zellen gültig. So fand Kisch[1]), daß die Konzentrationen von Methyl-, Äthyl-, Propyl- und Isoamylalkohol, die Exosmose der Hefeinvertase herbeiführten, 11,2, 4,8, 1,34 und 0,14 m betrugen; somit fallen diese Zahlen fast mit den Oxydasewerten zusammen. Wahrscheinlich sind die Narkoselösungen, die Exosmose in Pflanzenzellen erregen, ebensolchen Schwankungen unterlegen wie diejenigen, die auf tierische Organismen narkotisierend einwirken.

In der letzten Spalte der Tabelle ist das Verhältnis zwischen Oxydasewert und Overtons Narkosewert für Kaulquappen einer jeden Substanz angegeben. Im ganzen bleiben diese Verhältniszahlen konstanter als die entsprechenden Proportionen = Echeveriawert : Narkosewert. Die Zahlen erstrecken sich

[1]) Kisch, diese Zeitschr. 40, 152, 1912.

von 3 als Minimum bis 27 als Maximum, doch sind die Grenzwerte für 14 der 17 Verhältnisse 7 und 18. Wir haben oben bereits den hohen Quotienten für Äthylurethan erörtert. Der niedrige von Acetonitril (3) mag bis zum gewissen Grade ungenau sein, da das von Schuchardt bezogene Präparat stark nach einer Isocyanidverunreinigung roch. Die mit den einwertigen Alkoholen ermittelten Verhältniszahlen schwanken etwas mehr als die entsprechenden bei Echeveria. Hätte man jedoch die Alkoholkonzentrationen zum Vergleich herangezogen, die 50 % der Oxydase zerstören, anstatt derjenigen mit einer Anfangswirkung, so wären die Ungleichmäßigkeiten viel unbedeutender ausgefallen. Wir erhalten dann für Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butyl- und Isoamylalkohol die Werte: 22, 20, 19, 17 und 10.

Die Einwirkung der Kolloide auf pflanzliche und tierische Zellen.

Außer den Versuchen mit löslichen Substanzen sind von Czapek noch weitere Untersuchungen über den Einfluß mehrerer kolloidalen Lösungen in bezug auf die Exosmose ausgeführt worden. Auf den ersten Blick erscheinen die hierbei gewonnenen Resultate sehr beweiskräftig für seine Anschauung, daß die Oberflächenspannung der Exosmose erregenden Substanzen eine konstante Größe ist. Bei eingehenderer Betrachtung erweisen sich seine Folgerungen jedoch kaum als berechtigt. Wenn wir der Reihe nach die Resultate durchgehen, so finden wir, daß die Werte der Tributyrinlösung befriedigend mit der von Czapek aufgestellten Hypothese harmonieren. Bei den Natriumoleatversuchen ergab sich, daß eine $^{n}/_{1200}$-Lösung mit einer Oberflächenspannung von 0,774 geringe Exosmosewirkung ausübte, während die nächstfolgende Lösung ($^{n}/_{2400}$, Oberflächentension 0,92) wirkungslos blieb. Keine Angaben liegen über die Ölsäureversuche vor. Eine hochkonzentrierte Emulsion wies eine Oberflächenspannung von 0,285 auf, während bei der kritischen Lösung eine solche von 0,69 ermittelt wurde. Es wird uns nicht gesagt, welche Stärke diese Lösung besaß, doch ist es in jedem Falle unwahrscheinlich, daß bei einer derartigen Emulsion die Oberflächenspannung andauernd konstant bleiben würde, ganz gewiß nicht während der Versuchszeit von 24 Stunden.

Dieselben Einwände müssen in gewisser Hinsicht gegen die Lecithinemulsionversuche erhoben werden, obgleich sie, soweit sie mitgeteilt werden, sich der Czapekschen Theorie gut einfügen. Dagegen sind die Ergebnisse der Cholesterinemulsion nicht sehr zufriedenstellend. Die Oberflächenspannung einer Emulsion von unbekannter Konzentration wurde, bei Verdünnung auf die Hälfte, von 0,519 auf 0,579 reduziert, bei Verdünnung auf ein Viertel auf 0,782, und betrug, auf $^1/_8$ des Gehalts verdünnt, 0,788. Folglich steht die Oberflächenspannung nicht im direkten Verhältnis zur Konzentration. Aus den Resultaten scheint hervorzugehen, daß die Cholesterinemulsionen in keinem stabilen Zustande waren, so daß eine Konstanz der Oberflächentension während der 24 Stunden wohl ausgeschlossen ist. Sollten die Resultate aber doch Gültigkeit haben, so kann die kritische Tension zwischen 0,579 und 0,782 gelegen haben. Das zuletzt geprüfte Kolloid, das Saponin, rief bei einer Konzentration von 0,05 m Exosmose hervor. Diese Lösung wies eine Oberflächentension von 0,82 auf, bildet also eo ipso eine Ausnahme.

So sehen wir, daß nur 2 der 6 untersuchten Kolloide einen eindeutigen Beweis für die Czapeksche Hypothese erbringen, während mindestens 2 eine Ausnahmestellung einnehmen.

Die Einwirkung von ölsaurem Natrium auf Nierenzellen scheint ungefähr mit derjenigen auf Echeveria übereinzustimmen. Schon in sehr verdünnten Lösungen zerstört es geringe Oxydasemengen in $^1/_2$ Stunde, aber wie aus der Figur ersichtlich,

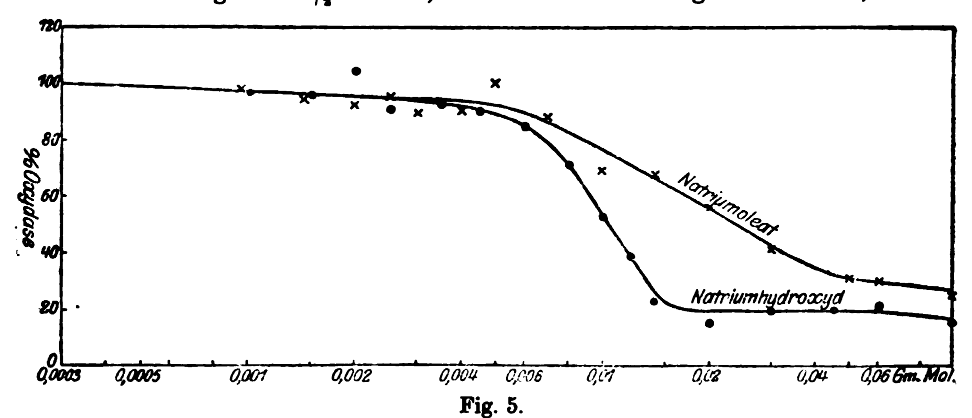


Fig. 5.

steigt die Kurve so allmählich und sanft an, daß die Grenzkonzentration unmöglich mit der erwünschten Genauigkeit fixiert werden kann. Wahrscheinlich ist dies bei 0,0003 m der Fall, während die auf Echeveria einwirkende zwischen 0,0004 und 0,0008 lag. Bei Lösungen oberhalb von 0,007 m steigt die Hemmungskraft von Natriumoleat auf die Oxydase eine Zeitlang rapide an, sobald ein gewisser Stärkegrad erreicht ist, jedoch fördern weitere Einengungen wenig. Dieselbe Beobachtung konnte in den Parallelversuchen mit Natriumhydroxyd angestellt werden. In niedrigen Konzentrationen erfolgte der Angriff des freien Alkalis auf die Oxydase nicht heftiger als der von Natriumoleat, durch Lösungen von 0,008 n und mehr wurde die Schädigung intensiver. Bei 0,014 n schien der Grenzwert erreicht — weitere Erhöhungen der Konzentration bis auf 0,10 n hatten wenig oder gar keinen Einfluß. Die mit den höheren Konzentrationen von Natriumhydroxyd sowohl wie von Natriumoleat gewonnenen Ergebnisse sind alle zu niedrig und in höherem Grade mit Fehlern behaftet als sonst, weil die Nierensubstanz, wenn sie erst einmal mit diesen Stoffen behandelt worden ist, nur sehr schwer wieder reingewaschen werden kann. Um diese Fehlerquelle möglichst auszuschalten, wurde folgendermaßen verfahren. 10 ccm gehackte Niere und Oleatlösung wurden mit 400 ccm Salzlösung in einem Becherglase tüchtig vermischt. Dann wartete man einige Minuten ab, bis sich die Nierenteilchen am Boden und an der Oberfläche gesetzt hatten und saugte die klare dazwischen befindliche Flüssigkeit mit der Pipette ab, was mehrere Male wiederholt wurde. Doch konnte trotz großer Vorsicht nicht vermieden werden, daß einige weder schwimmende noch sich senkende Nierenpartikel dabei mit entfernt wurden.

Wir wollen nicht unerwähnt lassen, daß das angewandte ölsaure Natrium ein käufliches, von Schuchardt geliefertes Präparat war. Eine andere, durch Neutralisieren von Ölsäure mit Natronlauge hergestellte Probe lieferte praktisch dieselben Resultate. Das Natriumoleat wurde in Ringer-Lösung, die 0,9 % NaCl, 0,024 % $CaCl_2$, 0,021 % KCl und 0,01 % $NaHCO_3$ enthielt, gelöst und bildete wegen des anwesenden Calciumsalzes eine schwach opalescierende Flüssigkeit. Das auf die Nierenzellen

einwirkende Oleat war deshalb eine Mischung der Calcium- und Natriumverbindungen, die sich bei verschiedenen Konzentrationen im Verhältnis zueinander verschoben. Obgleich aus diesem Grunde die Versuchsbedingungen ziemlich ungenau sind, so zeigt doch ein Vergleich der beiden Kurven in Fig. 5 zweifellos, daß die Wirkung des Oleats auf die Nierenoxydase hauptsächlich auf dem in ihm gebundenen Alkali beruht.

Die Saponinwirkung äußert sich bei der Nierenoxydase wesentlich anders als bei den Echeveriazellen. Die benutzte Saponinprobe stammte von Merck und bildete in Kochsalzlösung eine klare hellgelbe Flüssigkeit, während Czapeks Präparat eine farblose Lösung gab. Dieser Unterschied ist aber zu unbedeutend, um den Umstand zu erklären, daß das Mercksche Saponin seine anfängliche angreifende Wirkung auf die Oxydase bei einer Konzentration von 0,001 m entfaltete (wenn man das Molekulargewicht des Glucosids als 418 annimmt), während dies be dem von Czapek angewandten erst bei einem Stärkegrad zwischen 0,025 und 0,05 m der Fall war. Wie aus der Fig. 6 hervorgeht, zerstörten erhöhte Konzentrationen bis zu 0,025 m

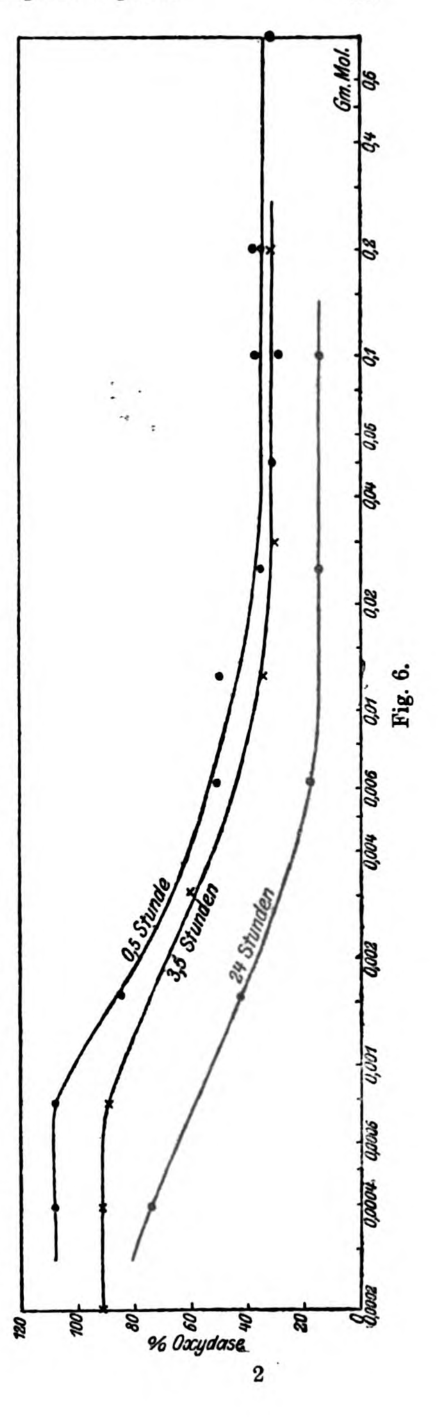


Fig. 6.

vermehrte Oxydasemengen. Noch größere Gehaltszunahme, sogar bis 0,8 m, verstärkte die Schädigung nicht. Behandlung der Nierenzellen $3^1/_2$ Stunden anstatt $^1/_2$ Stunde lang hatte nur einen kleinen gesteigerten Effekt; sogar 24stündige Einwirkung von 0,1 m-Saponinlösung brachte die radikale Inaktivierung der Oxydase nicht zustande. Die Tatsache, daß die beiden hier untersuchten Kolloide eine weitere Zerstörung nicht zu vollbringen vermochten, nachdem ein gewisser Konzentrationspunkt erreicht war, legt uns die Vermutung nahe, daß der kolloidale Zustand wohl bei dieser Erscheinung in gewissem Grade mitspielt. Auf derselben Ursache kann gleichfalls das analoge, mit Natriumhydroxyd gewonnene Resultat indirekt beruhen, denn das Alkali schien die äußeren Schichten der Nierenteilchen erheblich aufzuquellen und eine gelatinöse Schutzhülle über die inneren zu ziehen.

Die Einwirkung von Säuren auf lebende Zellen.

Kahlenberg und True[1]) geben an, daß alle Säuren mit genügender elektrolytischer Dissoziation das Wachstum junger Lupinenwurzeln bei einer Konzentration oberhalb $^n/_{6400}$ zu hemmen beginnen. Czapek fand, daß dieselbe Konzentration von verschiedenen Säuren Exosmose der gerbstoffhaltigen Inhaltsstoffe von Echeveria erzeugte. Und nicht nur starke Säuren wie Salz-, Oxal- und Schwefelsäure haben diesen Effekt, sondern genau ebenso auch viel weniger dissoziierte Säuren, z. B. Milch- und Essigsäure. Eine Deutung für dieses Phänomen gewährt nach Czapek die Möglichkeit, daß die Säuren durch Neutralisieren des in der Plasmahaut vorhandenen Natriumoleats wirksam werden. Doch beweisen die Versuche von Kisch, daß das, was für eine Pflanzenzelle gilt, keineswegs für andere gelten muß. So blieben Hefezellen Salzsäure, Schwefel- und Oxalsäure von 0,1 n gegenüber 24 Stunden lang resistent, und noch größere Widerstandsfähigkeit zeigte der Schimmelpilz Aspergillus niger.

Die verschiedenen Säuren wirken nicht mit derselben Stärke auf die Nierenoxydase ein; ihre Schädigung entspricht aber bis zum gewissen Grade ihrer elektrolytischen Dissoziation. Bei der

[1]) Kahlenberg und True, Botan. Gaz. 22, 81, 1896.

Untersuchung über die Säurenwirkung stellte sich heraus, daß spezielle Vorsichtsmaßregeln eingehalten werden müssen, um dem von den Gewebseiweißkörpern ausgeübten Schutz entgegenzuarbeiten, da sie bei der Säurenwirkung miteingreifen und sie sogar bis zu einem gewissen Grade neutralisieren.

So konnte z. B. festgestellt werden, daß nach $^1/_2$ stündiger Berührung der zerkleinerten Niere mit 10 ccm Schwefelsäure (0,008 n) 59 % der Oxydase zerstört waren. 20 ccm derselben Säure bewirkten Vernichtung von 82 % und 50 ccm von 91 %. In einer anderen Versuchsreihe wurde die zerhackte Niere mit 5, 10, 20 und 50 ccm Essigsäure (0,022 n) belassen mit dem Befund, daß danach 19, 46, 60 und 78 % des Enzyms gelähmt waren. Je größer das benutzte Volumen der Säure, desto weniger wurde sie durch die Eiweißkörper der Gewebe neutralisiert, und folglich fiel die Wirkung um so stärker aus. In all den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen betrug die benutzte Säuremenge 50 ccm, da größere Quantitäten nur wenig fördernden Einfluß hatten. In den Milch- und Essigsäureversuchen, die ich in meiner früheren Arbeit mitgeteilt habe, sind 20 resp. 10 ccm angewandt worden, daher die Unstimmigkeit zwischen den damals und jetzt gewonnenen Resultaten. Dieser bedeutende Einfluß des Reagensvolumens auf die zerstörte Oxydasemege kommt aber bei den Narkoticis nicht in Betracht, denn ihre Wirkung wird keineswegs durch die Proteine des Gewebes aufgehoben. So wirkte eine 50 ccm enthaltende Lösung nicht schädlicher auf das Ferment ein als eine von 10 ccm Inhalt, wie sie bei den meisten Versuchen zur Verwendung kam.

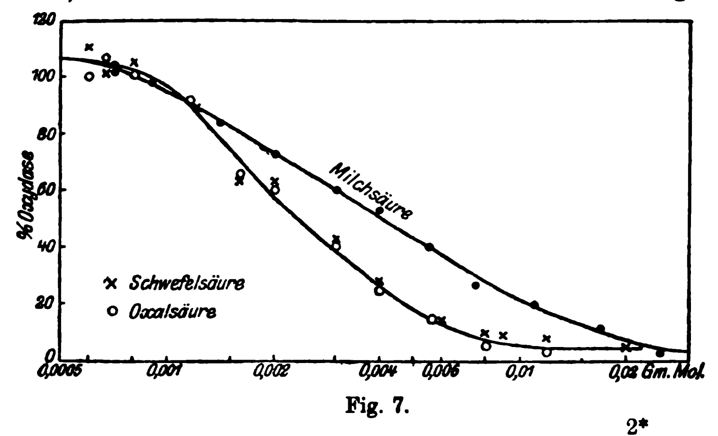


Fig. 7.

Die benutzten Säuren wurden in einer Salzlösung, die NaCl, KCl und $CaCl_2$, aber kein $NaHCO_3$ enthielt, aufgelöst. Die mit Schwefel-, Oxal- und Milchsäure ermittelten Resultate sind in Fig. 7 verzeichnet. Die für die beiden ersten Säuren erhaltenen Werte stehen einander so nahe, daß sie in eine einzige Kurve zusammenfallen. Milchsäure verhält sich insofern individuell, als sie bei Konzentrationen von 0,002 n und mehr weniger stark die Oxydase angreift und in Konzentrationen unterhalb 0,001 n schädlicher wirkt als die erstgenannten Säuren. Fig. 8 veranschaulicht die Resultate der Untersuchungen mit Ameisen-, Essig-, Propion- und Buttersäure. Bei den letzten

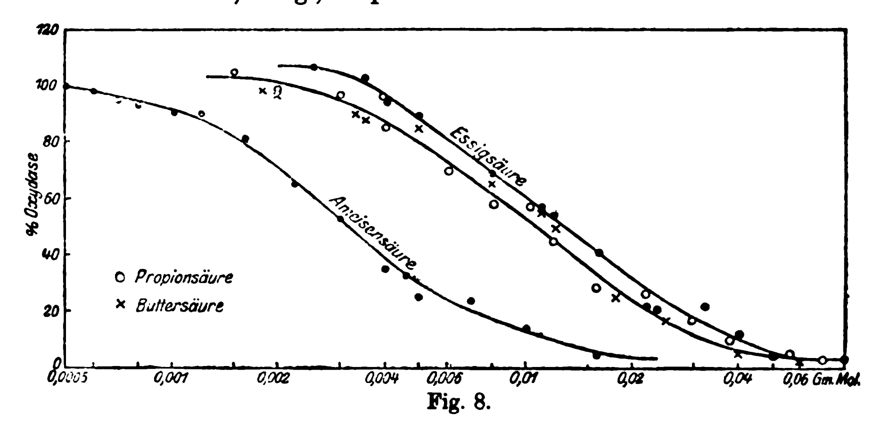


Fig. 8.

zwei waren die Werte fast identisch, so daß hier wiederum nur eine Kurve gezeichnet worden ist. Essigsäure stand in ihrer Wirkung unter ihnen, doch wirkte Ameisensäure in niedrigen Konzentrationen sogar etwas intensiver als Milchsäure. In Konzentrationen von 0,003 n und höher verläuft ihre Kurve fast gerade in der Mitte zwischen der Milchsäure- und Schwefelsäurekurve.

Es fällt ohne weiteres auf, daß alle die 7 untersuchten Säuren einander sehr ähnliche Kurven ergeben haben, und daß ihr Wirkungsumfang in bezug auf die Oxydase ein bedeutend ausgedehnterer als bei den geprüften Narkoticis ist. Die Konzentrationen, in denen sie eben anfangen, ihre Wirkung zu zeigen, und in denen sie die völlige Zerstörung der Oxydase herbeiführen, sind in nachstehender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle IV.

Säure	Konzentr. mit Anfangswirkung auf Oxydase	Konzentr. mit Zerstörung der Oxydase	Wirkungsumfang	Leitfähigkeit bei Konzentr. mit Anfangswirkung	Leitfähigkeit bei Konzentr. mit Zerstörung	Verhältnis der beiden Leitfähigkeiten
Essigsäure	0,0036 n	0,070 n	1 : 19	25	5,8	4,3 : 1
Propionsäure . . .	0,0022 n	0,060 n	1 : 27	27	5,3	5,1 : 1
Buttersäure . . .	0,0022 n	0,060 n	1 : 27	28	5,6	5,0 : 1
Milchsäure	0,0008 n	0,035 n	1 : 44	118	22,0	5,4 : 1
Ameisensäure . .	0,0005 n	0,022 n	1 : 44	174	35,0	5,0 : 1
Schwefelsäure . .	0,0009 n	0,013 n	1 : 14	325	256,0	1,27 : 1
Oxalsäure	0,0009 n	0,013 n	1 : 14	385	305,0	1,26 : 1

Die Werte bewegen sich in einem Einwirkungsbereich mit den Grenzen 1 und 14 für Schwefel- und Oxalsäure und 1 bis 44 für Milch- und Ameisensäure. Diese beträchtlichen Unterschiede beruhen wahrscheinlich auf der Tatsache, daß alle untersuchten Säuren, außer Schwefel- und Oxalsäure, in den Konzentrationen mit anfänglicher Schädigung viel stärker ionisiert sind als in denen mit maximaler Wirkung. Infolgedessen ist ihr Wirkungsumfang von großer Ausdehnung. Die Leitfähigkeit der Lösungen, die eben erst auf die Oxydase einwirkten und derjenigen, die sie gänzlich abtöteten, ist nach Ostwalds[1]) Angaben berechnet und in der Tabelle aufgeführt worden. Schwefel- und Oxalsäure sind meistens in beiden Konzentrationen ionisiert, ihre Leitfähigkeiten stehen im Verhältnis von 1,26 oder 1,27 zu 1, aber diejenigen der anderen Säuren, die höchstens zur Hälfte bis $^{1}/_{14}$ ionisiert waren, weisen Verhältniszahlen auf von ungefähr 5:1. Es ist ersichtlich, daß mit Ausnahme von Oxal- und Schwefelsäure die zerstörende Wirkung der Säuren mit ihrer Ionisation parallel verlief. Milch- und Ameisensäure, obgleich sie nur $^{1}/_{2}$ bis $^{1}/_{3}$ so viel ionisiert sind wie Schwefel- und Oxalsäure, setzten in niedrigeren Konzentrationen mit der Schädigung ein. Wenn man jedoch als Maßstab der Einwirkung die Konzentrationen nimmt, die vollständige Zerstörung der Oxydase bewirken, so kommen Schwefel- und Oxalsäure hinter Milch- und Ameisensäure, also in ihre richtige Reihenfolge.

[1]) Ostwald, Zeitschr. f. physikal. Chem. 3, 191, 1889. — Allgem. Chem. II. I. Leipzig.

Beziehung der Oxydasewerten zu den hämolytischen Werten.

Die so viel allmählichere Oxydasenparalyse durch die Säuren im Vergleich zu dem schärferen Ein- und Absetzen des narkotischen Effekts legt den Gedanken nahe, daß die Einwirkungsart bei diesen beiden Giftklassen möglicherweise eine verschiedene ist. Doch da die Säurenkonzentrationen, die die Oxydase schädigen, ganz auffallende Ähnlichkeit mit denjenigen aufweisen, die rote Blutkörperchen lackfarben machen, so ist es wahrscheinlich, daß auch sie ihren Einfluß durch die Lipoide ausüben. Es geschieht wohl nicht in genau derselben Weise, da sie nur wenig lipoidlöslich sind. Vielleicht beeinflussen sie direkt den physikalischen Zustand der lipoidartigen Plasmahaut.

Bestimmungen über hämolytische Konzentrationen der Narkotica, Säuren und anderen Substanzen sind von Wirgin[1]). Vandevelde[2]), Fühner und Neubauer[3]) und anderen gemacht worden. Die in der Tabelle aufgeführten Werte sind den Arbeiten der beiden letztgenannten Autoren entnommen außer denjenigen für Natriumoleat, der von Meyerstein[4]) ermittelt worden ist und für Saponin (Merck), den Pachorukow[5]) berechnet hat. Fühner und Neubauer haben die lackfarben machende Konzentration der Schwefelsäure nicht bestimmt, doch muß diejenige der Salzsäure, die von ihnen ermittelt ist, fast dieselbe sein und ist deshalb an ihrer Stelle zitiert. Auch der Wert der genannten Autoren für Kaliumhydroxyd ist anstatt des unermittelten für Natriumhydroxyd angegeben worden. Die hämolytischen Werte der Säuren sind in Grammäquivalenten, die der anderen Substanzen in gramm-molekularen Lösungen verzeichnet. Eine zweite Spalte der Tabelle enthält die entweder in dieser oder der vorhergehenden Arbeit ermittelten Oxydasewerte. Wir sehen, daß die Übereinstimmung der beiden Wertereihen bei 4 der 5 Alkohole und für die 3 Urethane sehr groß ist. Bei den Estern ist die Beziehung nicht ganz so naheliegend, was aber darauf zurückgeführt werden kann,

---

[1]) Wirgin, Zeitschr. f. Hygiene **46**, 149, 1904.

[2]) Vandevelde, Bull. soc. chim. Belgique **19**, 288, 1905; diese Zeitschr. **1**, 1, 1906.

[3]) Fühner und Neubauer, l. c.

[4]) Meyerstein, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **60**, 385, 1909.

[5]) Pachorukow, Arbeiten d. pharmakol. Institut zu Dorpat **1**, 1, 1888.

Tabelle V.

Substanz	Konzentration, die rote Blutkörperchen lackfarben macht	Konzentration, die auf Oxydase einwirkt	Quotient der zwei Konzentrationen
Methylalkohol	7,34	10,5	0,7
Äthylalkohol	3,24	4,8	0,7
Propylalkohol	1,08	1,5	0,7
Butylalkohol	0,32	0,32	1,0
Heptylalkohol	0,012	0,0065	1,8
Methylurethan	2,4	2,0	1,2
Äthylurethan	1,04	1,1	0,9
Propylurethan	0,35	0,29	1,2
Äthylpropionat	0,17	0,08	2,1
Äthylbutyrat	0,06	0,028	2,1
Propylacetat	0,16	0,055	2,9
Ameisensäure	0,0014	0,0005	2,8
Essigsäure	0,0037	0,0036	1,0
Propionsäure	0,0064	0,0022	2,9
Buttersäure	0,0081	0,0022	3,7
Schwefelsäure	(0,0005)	0,0009	0,6
Ammoniak	0,235	0,003	78,3
Natriumhydroxyd	(0,0075)	0,0003	25,0
Natriumoleat	0,00015	0,0003	0,5
Saponin	0,00024	0,001	0,24

daß, wie schon oben auseinandergesetzt, die Oxydasewerte durch die Nierenlipase, die die Säure der Ester in Freiheit setzt, heruntergedrückt werden. 3 der 4 organischen Säuren machten im Vergleich zur Oxydasehemmung erst in einer 3mal so starken Konzentration rote Blutkörperchen lackfarben, doch wirkten Essig- und Schwefelsäure bei fast demselben Prozentgehalt ein. Faßt man die Übereinstimmung der beiden Wertereihen summarisch als Ganzes ins Auge, so ist der Grad derselben zu hoch, als daß er auf einem bloßen Zufall beruhen könnte. Dagegen zeigten die Alkalien in ihrer Einwirkung auf rote Blutkörperchen und Oxydase keine Parallelität. Die bei ihnen auftretenden Verhältniszahlen 78 und 25 stehen ganz außerhalb der in der Tabelle ersichtlichen Reihen.

Die beiden untersuchten Kolloide, Natriumoleat und Saponin, wirkten in ähnlichen Konzentrationen auf die Oxydase wie auf die Erythrocyten ein, wenn auch der Grad der Abweichung hier etwas größer als bei den Narkoticis ist. Bei den kolloidalen Lösungen unterlaufen aber viel größere Versuchsfehler als bei den nichtkolloidalen, so daß wir mit Be-

rücksichtigung dieses Umstandes annehmen können, daß auch ihr Effekt auf die Oxydase und die Erythrocyten auf demselben Wege erfolgt, d. h. durch den Angriff auf die Lipoide.

Wenn Säuren schädlich auf tierische Zellen durch die Vermittlung der darin enthaltenen Lipoide einwirken, so könnte man erwarten, daß sich derselbe Prozeß auch in Pflanzenzellen abspielt. Die oben bereits zitierten Resultate von Czapek und von Kisch widerlegen jedoch diese Annahme vollständig. Vielleicht spielen die Seifen, wie Natriumoleat, eine wichtigere Rolle in pflanzlichen Zellen als in animalischen, so daß die Säuren eher mit ihnen in Reaktion treten als mit den neutralen Bestandteilen der lipoiden Plasmahaut. Die sehr unbedeutende Einwirkung von Säuren auf Hefezellen ist möglicherweise in ihrer Unfähigkeit, die Zellwände zu durchdringen, kausal begründet.

In letzter Linie wird der durch die hämolytischen Werte erbrachte zahlenmäßige Beweis wahrscheinlich eine bessere Stütze für die Lipoidhypothese sein als die narkotischen Grenzkonzentrationen für Kaulquappen und andere Lebewesen; vorläufig ist aber das Beweismaterial noch sehr unvollständig und mangelhaft. Es ist eine bekannte Tatsache, daß Chloroform, Chloralhydrat und viele der von Czapek und mir selbst untersuchten Substanzen Hämolyse der roten Blutkörperchen hervorrufen können. Doch fehlen uns exakte Bestimmungen, welche Konzentrationen gerade dazu erforderlich sind. Wie wir schon gesehen haben, ist es möglich, daß Alkohole und Ester durch ihren Einfluß auf die Oberflächenspannung wirksam sind. Nur zuverlässige Angaben über die hämolytischen Werte der weniger capillaraktiven Narkotica, wie Chloroform, Chloralhydrat und Phenol, können hier absolute, beweisbringende Gewißheit verschaffen.

Bisher ist die narkotische Einwirkung auf Zellen von Pflanzen und Tieren nur in bezug auf die Lipoid-Plasmahaut in Betracht gezogen worden. Es kann wohl aber ohne Zweifel angenommen werden, daß sie sich auch darüber hinaus erstreckt. Aller Wahrscheinlichkeit nach durchziehen Lipoidmembranen das Innere der Zelle, die, wie die Plasmahaut, Narkotica nach dem Meyer-Overtonschen Gesetz der Teilungskoeffizienten in sich aufnehmen.

Zusammenfassung.

Die Exosmose von Tannin, die nach Behandlung von Pflanzenzellen, wie von Echeveriazellen, mit verschiedenen narkotischen Lösungen auftritt, ist wahrscheinlich keine Oberflächenspannungswirkung, wie Czapek annimmt. 7 der von ihm untersuchten 29 löslichen Substanzen hatten in der exosmoseerregenden Konzentration eine Wasser-Luft-Oberflächenspannung von 0,82 bis 0,998. Somit zeugen sie beredt gegen seine Anschauung, daß eben diese Oberflächentension einen konstanten Wert, nämlich ungefähr 0,685, aufweist. Andererseits entsprechen die Konzentrationen, die Exosmose hervorrufen, annähernd denjenigen, die Kaulquappen und andere Organismen in Narkose versetzen, und außerdem den hämolytischen Werten. Also scheinen die Narkotica durch Auflösung in der lipoidhaltigen Plasmahaut ihre Wirkung zu entfalten, wie dies Overton zu erklären versucht hat.

Die Rolle der Lipoide in tierischen Zellen kann mittels Bestimmung der Einwirkung von verschiedenen Stoffen auf die Indophenoloxydase der Gewebe, die ein unlösliches, in ihrer Aktivität von Lipoiden abhängiges Enzym ist, ermessen werden. Die Konzentrationen der Narkotica, die die erste bemerkbare Oxydaseschädigung ausüben, sind ungefähr 2 mal so stark wie diejenigen, die Exosmose des Tannins von Echeveriazellen erregen. Die einzelnen Verhältniszahlen zwischen Oxydase- und Echeveriawerten bewegten sich von 0,9 bis 2,8 für die 17 geprüften Substanzen. Bedenkt man, daß die Konzentrationen der letzteren zwischen 1 und 720 schwankten, so ist die Übereinstimmung auffallend.

Das kolloidale Natriumoleat wirkte bei derselben Konzentration auf die Oxydase wie auf Echeveria ein, Saponin dagegen bei einer 40 mal so kleinen.

Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Milch-, Oxal- und Schwefelsäure griffen die Oxydase in einer Konzentration an, die mehr oder weniger ihrer elektrischen Leitfähigkeit entsprach. Diese Stärkegrade fallen auch grob mit den von Führer und Neubauer ermittelten hämolytischen Werten zusammen, woraus man den Schluß ziehen kann, daß die Säuren die Zellen durch den Angriff auf die in ihnen enthaltenen Lipoide schädigen.

Beiträge zur Kenntnis des oxydativen Abbaues der Eiweißkörper.

Von

Otto Eisler.

(Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Prof. Dr. Otto v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 8. April 1913.)

Zweifellos bietet für die Frage, in welcher Weise die einzelnen Aminosäuren innerhalb des Eiweißmoleküls miteinander verknüpft sind, die Untersuchung intermediärer Eiweißoxydationsprodukte ein besonderes Interesse. Während die von Maly zuerst beschriebenen und in Hofmeisters Laboratorium eingehender studierten Peroxyprotsäuren von Permanganat bei niederer Temperatur nicht mehr angegriffen werden, gelingt es, wie v. Fürth in Hofmeisters Laboratorium gefunden hat, wenn man die darin enthaltenen Oxalsäuregruppen mit Barytwasser abgesprengt hat, dem Oxydationsmittel neue Angriffspunkte zu schaffen. Durch Oxydation derartiger „Desaminoprotsäuren" gelangte v. Fürth zu einer neuen Kategorie stark saurer, sauerstoffreicher Eiweißderivate, den „Kyroprotsäuren". Die bei der weitgehenden Oxydation stattfindende Lockerung des Molekularverbandes des Eiweißmoleküls kommt in dem Umstande zum Ausdruck, daß die Kyroprotsäuren viel locker abspaltbaren Säureamidstickstoff enthalten und daß, zum Unterschiede von nativen Eiweißkörpern, ein großer Teil des darin enthaltenen Stickstoffes durch salpetrige Säure abspaltbar erscheint[1]).

In Fortführung obiger Untersuchungen habe ich nun zunächst den oxydativen Abbau reinen Caseins nach Ham-

[1]) Vgl. die Literatur und Diskussion der Befunde: Otto v. Fürth, Probleme der physiologischen und pathologischen Chemie 1, 26 bis 30, 1912.

marsten, sowie eines einfacheren Eiweißkörpers, des von Weyl aus dem Fibroin gewonnenen Sericoins, ausgeführt und zur Ergänzung meiner Befunde auch den oxydativen Abbau eines synthetisch dargestellten Polypeptids, des Alanyl-glycyl-glycins, in Angriff genommen.

I. Oxydative Spaltung des Caseins.

A. Darstellung des Analysenmaterials.

Als Ausgangsmaterial wurde reines Casein nach Hammarsten, wie es von der Firma Kahlbaum in den Handel gebracht wird, verwendet. Mit 50 g dieses Caseins wurde ein Vorversuch angestellt; derselbe Gang der Oxydation wurde nachher beim Hauptversuche eingehalten.

500 g Casein wurden in 500 ccm $10^0/_0$iger Natronlauge in der Hitze gelöst, auf 6 l mit H_2O verdünnt und auf Zimmertemperatur gebracht. Sodann wurde in kleinen Portionen unter sorgfältiger Vermeidung einer Temperatursteigerung Calciumpermanganat eingetragen. Anfangs verschwand die Rotfärbung augenblicklich, später immer langsamer, bis schließlich nach Verbrauch von ca. 700 g Calciumpermanganat noch nach 3 Stunden keine Entfärbung zu bemerken war. Diese trat beim Stehen der Flüssigkeit erst über Nacht ein. Bei der Oxydation machte sich eine starke Ammoniakentwicklung bemerkbar. Es wurde nun der massenhaft ausgefallene Braunsteinschlamm auf großen Büchnerschen Filtern abgetrennt, scharf abgepreßt und einige Male noch mit H_2O ausgekocht. Das klare, hellgelbe Filtrat zeigte schöne Biuretreaktion, keine Millonsche Reaktion, gab mit Phosphorwolframsäure einen weißen, amorphen, in der Hitze löslichen Niederschlag, wurde durch neutrales Bleiacetat, durch Bleiessig und durch Mercuriacetat gefällt.

Analysen des Hg-Salzes („Peroxyprotsäure").

a) Hg-Bestimmung: 0,757 g Substanz gaben 0,5115 g HgS, entsprechend 0,4407 g Hg = 58,2 $^0/_0$ Hg.

b) N-Bestimmung: 0,612 g Substanz verbrauchten 28,6 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, entsprechend 0,04004 g N = 6,5 $^0/_0$ N.

Die Hauptmenge des Filtrates wurde nun 3 Stunden lang mit einem Überschusse von Ätzbaryt gekocht. Am Anfange starke NH_3-Entwicklung, die zum Schlusse vollständig aufhörte.

Es wurde nun vom Rückstand, der hauptsächlich aus einem Überschusse von Ätzbaryt und aus oxalsaurem Baryt bestand, abfiltriert. Das Filtrat reagierte alkalisch, enthielt einen Überschuß an Barium, gab die Biuretreaktion, keine Millonsche Reaktion, ferner nach Neutralisation einen voluminösen Niederschlag mit Mercuriacetat und Bleiessig, einen schwachen Niederschlag mit neutralem Bleiacetat. Phosphorwolframsäure fällte in saurer Lösung einen in der Hitze löslichen Niederschlag. In einem kleinen Teile des Filtrats wurde das Ba durch CO_2 entfernt, der Überschuß von CO_2 durch Essigsäure vertrieben mit NaOH neutralisiert und mit Mercuriacetat gefällt.

Analysen des Hg-Salzes („Desaminoprotsäure").

a) Hg-Bestimmung: 0,6121 g Substanz gaben 0,39 g HgS, entsprechend 54,8 % Hg.

b) N-Bestimmung: 0,3276 g Substanz verbrauchten 14,8 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, entsprechend 6,3 % N.

Die Hauptmenge der Flüssigkeit wurde sofort weiteroxydiert. Nach Verbrauch von ca. 100 g Ca-Permanganat trat nach 3stündigem Stehen keine Entfärbung mehr ein; es wurde, analog wie früher, vom Braunsteinschlamme abfiltriert; das klare, hellgelbe Filtrat zeigte Biuretreaktion, keinen Millon, gab mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag, wurde von Bleiessig, neutralem Blei- und Mercuriacetat gefällt.

Analysen des Hg-Salzes („Kyroprotsäure").

a) Hg-Bestimmung: 0,1109 g Substanz gaben 0,0794 g HgS, entsprechend 61,7 % Hg.

b) N-Bestimmung: 0,307 g Substanz verbrauchten 10,1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4, entsprechend 4,6 % N.

Die Hauptmenge des Filtrates wurde wieder mit Ätzbaryt 3 Stunden lang gekocht, der aus Bariumoxalat und Ätzbaryt bestehende Niederschlag abgenutscht. Im stark eingeengten Filtrate wurde der Überschuß von Barium mit CO_2 entfernt, CO_2 durch Essigsäure vertrieben und mit Natriumhydroxyd neutralisiert.

Die Flüssigkeit zeigte folgende Reaktionen: Sie gab Biuretreaktion, mit Phosphorwolframsäure in saurer Lösung einen in der Hitze löslichen Niederschlag, wurde durch Mercuriacetat gefällt; neutrales Bleiacetat gab nur einen schwachen Niederschlag; im klaren Filtrate des Bleiacetatniederschlages fiel die Hauptmenge der Substanz durch Mercuriacetat aus.

Ich fällte nun die Gesamtmenge der Substanz zunächst mit einem Überschusse von Mercuriacetat. Der gelblichweiße, amorphe Niederschlag wurde auf einem Büchnerschen Filter gesammelt, scharf abgepreßt, einige Male mit H_2O verrieben und wieder scharf abgepreßt. Schließlich wurde er bei 100° getrocknet. Die Ausbeute betrug 30 g. Das Filtrat gab mit Mercuriacetat gar keine Fällung mehr, zeigte auch keine Biuretreaktion.

Der getrocknete Hg-Niederschlag wurde nun staubfein zerrieben, in H_2O suspendiert, mit H_2S zersetzt, vom HgS abfiltriert, der HgS-Niederschlag mit H_2O ausgekocht, von neuem in H_2O suspendiert, H_2S eingeleitet und das HgS wieder abfiltriert. In den vereinigten Filtraten wurde der Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom entfernt und das gesamte sauer reagierende Filtrat zur Trockene gedampft. Da sich die freie Säure als zur Analyse untauglich erwies (stark hygroskopisch, klebrig), auch eine versuchte Kuppelung mit Naphthalinsulfochlorid keinen Erfolg hatte, mußte wieder auf das Hg-Salz zurückgegriffen werden. Es wurde vorerst mit Natriumhydroxyd genau neutralisiert, mit neutralem Bleiacetat ein schwacher Niederschlag ausgefällt, der, da er für Analysen zu gering war, entfernt wurde. Das Filtrat des Bleiacetatniederschlages wurde nun mit Mercuriacetat gefällt, filtriert, gründlich mit H_2O gewaschen, bei 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zu den unten angeführten Analysen benutzt. Die Ausbeute betrug 20 g („Desaminokyroprotsäure").

B. Analysen der Desaminokyroprotsäuren.

I. Elementaranalyse.

1. C- und H-Bestimmung.

Die Bestimmung wurde nach Liebig in gewöhnlicher Weise, nur mit vorgelegtem Bleisuperoxyd, das auf 160° erwärmt wurde, ausgeführt.

a) Einwage: 0,2805	C = 18,19 %		b) Einwage: 0,241	C = 18,52 %	
H_2O: 0,0641	H = 2,55 „		H_2O: 0,0573	H = 2,7 „	
CO_2: 0,1868			CO_2: 0,1637		

2. N-Bestimmung.

Sämtliche N-Bestimmungen wurden nach Kjeldahl ausgeführt:

a) Einwage:	0,4332	verbraucht	15,6 ccm	$^n/_{10}$-H_2SO_4	= 5,04 % N
b) „	0,5891	„	21,5 „	„	= 5,11 „ „
c) „	0,4754	„	16,9 „	„	= 4,98 „ „

3. Hg-Bestimmung.

Das Hg wurde in salzsaurer Lösung als HgS gefällt und im Goochtiegel gewogen.

a) Einwage: 0,3242 g
0,2235 g HgS = **59,39** % Hg.

b) „ 0,6293 g
0,4349 g HgS = **59,39** % Hg.

c) „ 0,7441 g
0,5107 g HgS = **59,10** % Hg.

4. S-Bestimmung.

Es wurden 2 Bestimmungen ausgeführt, die erste nach Liebig-du Ménil im Silbertiegel mit KOH und KNO_3, die zweite nach Carius im Bombenrohr, das 8 Stunden lang auf 300° erwärmt wurde.

a) Einwage: 0,5875 g
0,0169 g $BaSO_4$ = **0,39** % S.

b) „ 0,1173 g
0,0036 g $BaSO_4$ = **0,42** % S.

II. Stickstoffverteilung.

1. Bestimmungen der NH_2-Gruppen.

a) Nach der Methode von van Slyke.

Eine gewogene Menge des Hg-Salzes wurde gründlich in wässeriger Suspension mit H_2S zersetzt, das klare Filtrat von H_2S befreit, auf 100 ccm aufgefüllt. In 10 ccm wurde der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt, um etwaige Verluste bei der Zersetzung zu konstatieren, doch ergab diese Bestimmung hier wie auch in allen folgenden Fällen eine quantitative Ausbeute der eingewogenen Substanz an freier Säure. Die eigentliche Bestimmung wurde ebenfalls in je 10 ccm in dem von Donald D. van Slyke[1]) angegebenen und von D. Klein verbesserten Apparate[2]) durchgeführt. Der durch die salpetrige Säure zugleich mit NO_2 entwickelte Stickstoff wurde im Azotometer über H_2O aufgefangen, der NO_2 dann in einer Hempelschen Pipette, die mit alkalischem Kaliumpermanganat gefüllt war, absorbiert und das Volumen des reinen Stickstoffes gemessen. Zur quantitativen Abspaltung des N war die Einwirkung der salpetrigen Säure durch ca. 15 Minuten erforderlich. Bei beiden Analysen ist die in 10 ccm Waschwasser gelöste Stickstoffmenge, die durch eine Kontrollbestimmung ermittelt wurde, in Abrechnung gebracht.

Bei der Berechnung des Prozentgehaltes wurde natürlich, da die Reaktion nach der Gleichung

$$R - NH_2 + HNO_2 = ROH + N_2 + H_2O$$

verläuft, nur die Hälfte des gemessenen Volumens an Stickstoff in Betracht gezogen.

---

[1]) D. D. van Slyke, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **43**, 3170, 1911.
[2]) D. Klein, Journ. of biolog. Chem. **10**, 287, 1911.

Einwage: 3,2381 g auf 100 ccm aufgefüllt.

a) 10 ccm gaben 10,3 ccm N bei 27° und 757 mm = **1,74%** N
b) 10 „ „ 10,0 „ „ „ 24° „ 757 „ = **1,71** „ „

b) Formoltitration.

In der wie bei a) präparierten Substanz wurden durch Titration die NH_2-Gruppen ermittelt. Je 20 ccm wurden mit $^n/_{10}$-NaOH gegen empfindliches neutrales Lackmuspapier neutralisiert, mit je 20 ccm Formollösung (40%, mit Phenolphthalein versetzt und mit NaOH bis zum zarten Rosaton titriert) versetzt und schnell mit $^n/_{10}$-NaOH bis zur starken Rotfärbung titriert. 1 ccm $^n/_{10}$-NaOH entspricht 1,4 mg N.

Einwage: 0,7441 g auf 100 ccm aufgefüllt.

a) 20 ccm verbrauchen nach Zugabe der Formollösung 1,8 ccm $^n/_{10}$-NaOH = **1,69%** N.

b) 20 ccm verbrauchen nach Zugabe der Formollösung 1,85 ccm $^n/_{10}$-NaOH = **1,74%** N.

c) 20 ccm verbrauchen nach Zugabe der Formollösung 1,7 ccm $^n/_{10}$-NaOH = **1,6%** N.

2. Basischer Stickstoff.

Die Substanz wurde 8 Stunden lang mit der 20fachen Menge 20% HCl am Rückflußkühler gekocht, dann durch H_2S von Hg befreit, das klare Filtrat mit 150 ccm 10%iger Phosphorwolframsäure gefällt, nach 48stündigem Stehen abfiltriert, der Niederschlag mit HCl und phosphorwolframsäurehaltigem Wasser gewaschen, im Kjeldahl-Kolben unter ständigem Schütteln oxydiert und der Stickstoff ermittelt.

a) Einwage: 0,6293 g verbraucht 2,0 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = **0,44%** N,
b) „ 1,0087 g „ 3,2 „ „ = **0,44** „ „

3. Bestimmung der NH_2-Gruppen nach Hydrolyse.

Die wie bei der Bestimmung des basischen Stickstoffes präparierte Substanz wurde zur Ermittlung der NH_2-Gruppen nach der Methode von van Slyke benutzt.

Einwage: 0,6411 g auf 100 ccm.

a) 10 ccm gaben 5,9 ccm N bei 23° und 748 mm = **5,08%** N,
b) 10 „ „ 5,8 „ „ „ 21° „ 748 „ = **5,05** „ „

III. Bestimmung der Carboxylgruppen.

Die wie bei der van Slyke-Bestimmung vor der Hydrolyse präparierte Substanz wurde zur Ermittlung der Carboxylgruppen durch direkte Titration mit $^n/_{10}$-NaOH benutzt. Es ergab sich, daß die Werte bei der einfachen Titration in 90% alkoholischer Lösung (bei Benutzung von Phenolphthalein als Indicator) mit denen, welche bei der Titration in wässeriger Lösung unter Zugabe von neutralem Formaldehyd (zur Deckung von Aminogruppen) erhalten wurden, übereinstimmen. Diese sind also die richtigen.

Einwage: 1,8603 g auf 100 ccm.

a) 10 ccm verbrauchen 4,5 ccm $^n/_{10}$-NaOH = 10,88 % COOH

b) 10 „ „ 4,5 „ „ „ = 10,88 % „

Damit ist die Reihe der Analysen abgeschlossen. Oxalsäure und NH_3 sind unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten nicht vorhanden, was ja auch, da ein desamidiertes Produkt vorliegt, leicht verständlich ist.

Erwähnen will ich noch, daß ich versucht habe, durch Kochen der freien Säure mit frischgefälltem $Cu(OH)_2$ ein Kupfersalz herzustellen; doch war dasselbe hygroskopisch, also zur Analyse untauglich.

C. Chemische Charakteristik der erhaltenen Säure.

Zusammenstellung der Analysen.

Elementaranalyse	Mittel %	Zusammensetzung der freien Säure %	Zusammensetzung des Caseins %
C 18,19 %, 18,52 % . . .	18,35	44,96	53,0
H 2,55 %, 2,7 %	2,62	6,72	7,0
N 5,04 %, 5,11 %, 4,98 %	5,04	12,35	15,7
S 0,39 %, 0,42 %	0,4	0,98	0,8
O	14,29	34,99	22,65
Hg 59,39 %, 59,39 %, 59,1 %	59,3	—	—
	100,00	100,00	

COOH = 10,88 %.
N : O = 1 : 2,5[1]); N : COOH = 1 : $^2/_3$.
N:C:H:Hg = 1:4,25:7,28:0,82.

Stickstoffverteilung %	Mittel %
Gesamtstickstoff: 5,04	5,04
Aminosäurestickstoff: 1,74, 1,71, 1,69, 1,74, 1,6	1,7
NH-Gruppen-Stickstoff: (Gesamt-N — Amino-N)	3,34
Basenstickstoff: 0,44, 0,44	0,44

N : Amino-N : Imino-N : Basen-N = 1 : 0,33 : 0,66 : 0,09.

Aus dem Verlaufe der Oxydation und aus den erhaltenen Analysenzahlen ist klar zu ersehen, daß die erhaltenen Produkte große Ähnlichkeit mit denen aufweisen, die bereits v. Fürth in seiner Arbeit beschrieben hat. Es liegt also eine bestimmte Kategorie von Eiweißderivaten vor, die eng miteinander verwandt sind; nur scheint es mir, daß die Einteilung in Peroxyprotsäure — Kyroprotsäuren einerseits, Desaminoprotsäuren — Desaminokyroprotsäuren andererseits nicht streng einzuhalten sein

[1]) Beim Casein beträgt N : O = 1 : 1,26.

wird. Diese beiden Gruppen zeigen merkliche Unterschiede. Hauptsächlich sind es die abspaltbare Oxalsäure und der abspaltbare Säureamidstickstoff der nicht desamidierten Produkte, die den Unterschied bedingen. Das Verhältnis der einzelnen Glieder untereinander jedoch zeigt schon wesentlich geringere Differenzen. So könnte man, glaube ich, bei stärkerer Alkalität der zu oxydierenden Flüssigkeit sofort zu tiefer oxydierten Körpern, die der Oxydationsstufe der Kyroprotsäuren entsprächen, gelangen, ohne vorher die Desamidierung durchführen zu müssen. Auch würde man sicherlich bei genauem Einhalten aller Versuchsbedingungen — hauptsächlich bei ganz gleichem Alkaligehalt und derselben Grenze für die Dauer der Entfärbung — auch zu genau denselben Produkten kommen. Bei späteren Untersuchungen wird man diesen Umstand wohl berücksichtigen müssen.

Was den chemischen Charakter der erhaltenen Substanz anbelangt, soweit man aus den Analysenzahlen darauf schließen kann, sind besonders zwei Dinge bemerkenswert: Das Verhältnis des Sauerstoffes zum Stickstoff einerseits und das Verhältnis des durch salpetrige Säure abspaltbaren Stickstoffes zum Gesamtstickstoff andererseits.

Wie wir sehen, ist der Sauerstoffgehalt im Verhältnis zum Stickstoffgehalt wesentlich gestiegen. Dies ist ja auch leicht erklärlich. Durch die oxydative Spaltung werden wohl zunächst die Seitenketten im Eiweißmolekül angegriffen und zu Carboxylgruppen oxydiert, was bereits wesentlich das Verhältnis zugunsten des Sauerstoffes verschiebt. Darauf weist ja auch der große Prozentsatz der durch direkte Titration ermittelten sauren Gruppen hin. Nehmen wir das Fischersche Schema zu Hilfe:

$$\begin{array}{cc} \text{—NH.}\underset{\displaystyle R}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{.CO—NH.}\underset{\displaystyle R_1}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{.CO—} \end{array}$$

so werden sicherlich die mit R und R_1 bezeichneten Komplexe, wie schon oben erwähnt, zu COOH-Gruppen oxydiert. Sie werden aber zweifelsohne auch teilweise vollständig abgespalten die CH-Gruppe dann über CH_2 zu CO oxydiert; man erhält dann Komplexe

$$\text{—NH.}\underset{\displaystyle \text{COOH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{.CO....NH.CO.CO—,}$$

wovon der eine Teil bei der Desamidierung als Oxalsäure abgespalten wird. Die wesentliche Vermehrung des Sauerstoffgehaltes rührt also sicherlich bei den desamidierten Produkten von den COOH-Gruppen her. Das ermittelte Verhältnis N:O = 1:2,5 würde mit dem Schema

```
—NH.CH.CO—NH.CH.CO—
    |         |
   COOH      COOH
```

insofern nicht ganz übereinstimmen, als 3 O auf 1 N erforderlich wären und auch das Verhältnis N:COOH 1:1 sein müßte, statt der erhaltenen Relation N:COOH = 1:$^2/_3$ (s. u.).

Viel größer aber ist die Schwierigkeit, den Gehalt des durch salpetrige Säure abspaltbaren Stickstoffes mit dem Fischerschen Schema in Einklang zu bringen. Würden wir da eine gerade, unverzweigte, in den Seitenketten vollständig oxydierte Kette annehmen, müßte lediglich ein Tripeptid vorliegen,

```
NH2.CH.CO—NH.CH.CO—NH.CH.COOH
    |         |         |
   COOH      COOH      COOH
```

denn nur ein solches würde ein Drittel des Stickstoffes in nach van Slyke abspaltbarer Form enthalten. Daß dies unmöglich ist, zeigt sofort der Gehalt an Schwefel und an basischem Stickstoff, da für beides ein viel größeres Molekulargewicht, als es einem Tripeptid entsprechen würde, erforderlich wäre. Die nächstliegende Erklärung wäre vielleicht die, daß wir es mit aus tripeptidartigen Komplexen zusammengesetzten, verzweigten Ketten zu tun haben, wo entweder die zweibasischen Säuren untereinander, oder zweibasische Säuren mit Diaminosäuren brückenartige Verkettung herstellen. Im ersteren Falle läge also eine anhydridartige Verkettung, im zweiten (viel plausibleren) Falle eine glycyl-glycinartige Verkettung vor.

Führen wir diesen Gedanken an einem Schema durch, indem wir uns Komplexe aus je 3 Gliedern (die durch den oxydativen Abbau beliebiger Seitenketten zu Carboxylen hervorgegangen sind) etwa durch die säureamidartige Verkettung von Glutaminsäure- und Lysinkomplexen miteinander verkettet denken, so würde sich z. B. für das neungliedrige Schema

```
NH2.CH.CO—NH.CH.CO—NH.CH.COOH
    |          |         |
    CH2        COOH      COOH
    |
    CH2
    |
    CO─┐
       ↓
  CH2.NH
  |
  CH2
  |
  CH2
  |
  CH2
  |
NH2.CH.CO—NH.CH.CO—NH.CH.COOH
             |         |
             (CH2)2    COOH
             |
             CO─┐
                ↓
             CH2.NH
             |
             (CH2)3
             |
NH2.CH.CO—NH.CH.CO—NH.CH.COOH
    |                  |
    CH2                COOH
    |
    CH2
    |
    CO—
```

die Relation $N_1 : C_{3,54} : H_{5,36} : O_{2,01} : (NH_2)_{0,27} : (NH)_{0,72} : (COOH)_{0,64}$ ergeben, der die gefundene Relation

$$N_1 : C_{4,25} : H_{7,28} : O_{2,5} : (NH_2)_{0,33} : (NH_2)_{0,66} : (COOH)_{0,66}$$

immerhin ziemlich nahesteht.

Im Widerspruch zu obigem Schema steht der hohe Quecksilbergehalt und der niedrige Gehalt an basischem Stickstoff. Das gefundene Quecksilber würde dem gefundenen Werte an Carboxylgruppen keineswegs entsprechen, da mit zweiwertigem Quecksilber gefällt worden ist und bei der Bindung $\begin{matrix}COO\\COO\end{matrix}\!\!>\!Hg$ nicht einmal die Hälfte des tatsächlich gefundenen Quecksilbers im Molekül vorhanden sein könnte. Die Bindung ist also sicherlich eine viel kompliziertere, etwa vielleicht dem Schema $\begin{matrix}CH_2.NH\\ \vdots \\ COO\end{matrix}\!\!>\!Hg$

entsprechend. Der basische Stickstoff, der durch Fällung mit Phosphorwolframsäure ermittelt wurde, erscheint hier im Gegensatz zu dem später beschriebenen Oxydationsprodukt des Fibroins sehr spärlich, trotzdem die Menge der Diaminosäuren im Casein viel größer ist, als im Fibroin. Doch möchte ich bemerken, daß die Bestimmung des Basenstickstoffes in diesem Produkte (Casein) nicht genau sein dürfte, da für diese Bestimmung nur mehr wenig Material vorhanden war. Die Angabe v. Fürths, derzufolge der basische Stickstoff bei der fortschreitenden Eiweißoxydation aus den hochmolekularen Komplexen ganz verschwindet, ist demnach zu berichtigen. Die Täuschung wurde durch den Umstand hervorgerufen, daß Phosphorwolframsäure allerdings, zu einer neutralen Lösung einer Kyroprotsäure hinzugefügt, keine Fällung verursacht, sondern erst, nachdem mit einer Mineralsäure angesäuert worden ist. Die anderen Analysenzahlen bieten weniger Bemerkenswertes. Daß der Gehalt an Wasserstoff und Kohlenstoff abgenommen hat, erscheint aus dem hohen Sauerstoffgehalt selbstverständlich. Der Schwefelgehalt, dessen Beseitigung nicht gelungen ist, würde eine relativ große Beständigkeit der schwefelhaltigen Komplexe erweisen. Die van Slyke-Bestimmung nach erfolgter Hydrolyse ergibt noch, daß der gesamte Stickstoff nach der Hydrolyse in NH_2-Gruppen vorliegen muß, daß also die erhaltene Desaminokyroprotsäure den Stickstoff nur in Form von NH_2- und NH-Gruppen, nicht aber in Form der Hydrolyse gegenüber resistenten, zyklischen Komplexen führt.

Damit wären die Versuche und deren Ergebnisse bei diesem Oxydationsprodukt des Caseins abgeschlossen. Eine vollständige Hydrolyse konnte wegen der schwierigen Materialbeschaffung und der kleinen Ausbeute nicht einmal versucht werden.

Ich gehe nun an die Beschreibung der Oxydation des Fibroins.

II. Oxydative Spaltung des Fibroins.

A. Vorbereitung des Ausgangsmaterials.

Als Ausgangsmaterial wurden Rohseidenabfälle, die von der Firma Schmid frères in Basel geliefert wurden, verwendet. Um dieselben vom Sericin zu befreien, wurden sie in Portionen von $^1/_4$ kg zunächst bei

gewöhnlichem Druck in einem Blechtopf 3 Stunden lang mit der 20fachen Menge H_2O gekocht, dann in einem Papinschen Drucktopf wieder 3 Stunden lang mit der 10fachen Menge H_2O gekocht, nachher noch einmal im Blechtopf mit H_2O behandelt. Sonach wurden sie in der Preßmaschine ausgepreßt und an der Luft getrocknet. Da das Material noch ziemlich verunreinigt war, verwendete ich eine von Th. Weyl angegebene Methode, Seide umzufällen und dadurch zu reinigen. Ich löste die Menge Seide, die ich zur Oxydation verwenden wollte, in der 3fachen Menge rauchender Salzsäure (die Lösung erfolgte leicht in der Kälte), filtrierte durch Glaswolle von den ungelöst gebliebenen Verunreinigungen ab und goß nun die dunkelbraun gefärbte Lösung in die 5fache Menge Alkohol (HCl.5). Es fiel augenblicklich ein weißer, sehr voluminöser Körper aus, der abfiltriert und mit H_2O gewaschen wurde. Dieser von Th. Weyl mit dem Namen Sericoin bezeichnete Körper wurde dann in NaOH gelöst und der Oxydation unterworfen.

B. Oxydation des Sericoins.

Da über das Verhalten des Fibroins bei der Oxydation noch nichts bekannt war, versuchte ich zunächst, festzustellen, ob man überhaupt nach durchgeführter Oxydation noch greifbare Körper erhält und ob die Oxydation ähnlich verläuft, wie beim Casein. Zu diesem Zwecke löste ich 50 g des Sericoins in 300 ccm 10%iger Natronlauge, (die Lösung erfolgte in der Hitze leicht), verdünnte nach dem Erkalten auf 2 l und oxydierte unter den beim Casein beschriebenen Bedingungen mit Calciumpermanganat. Nach Zugabe von 60 g stand die Oxydation still; ich filtrierte von Braunsteinschlamm ab; die hellgelbe Flüssigkeit zeigte analoge Reaktionen wie die entsprechende beim Casein. Ich desamidierte sie unter denselben Bedingungen[1]), oxydierte dann weiter, wobei ich diesmal nur 5 g Permanganat verbrauchte. Nach erneutem Desamidieren fällte ich die neutrale Lösung mit Mercuriacetat. Der filtrierte Niederschlag wurde bei 90° getrocknet.

N-Bestimmung:

a) 2,7231 g verbrauchten 29,6 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,52% N.
b) 1,296 g „ 14,8 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,6 % N.

Dieser Vorversuch ergab also, daß sich wohl das Fibroin auf ähnliche Weise oxydieren lasse wie das Casein, jedoch zeigt der erhaltene Stickstoffgehalt, wie auch die verbrauchte Menge

[1]) Das hier mit Hg-Acetat gefällte Salz ergab bei der N-Bestimmung: Einwage: 0,8291 g verbrauchten 22,4 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,8% N.

des Ca-Permanganats, daß man zu bedeutend tiefer abgebauten Körpern gelangt als beim Casein. Beim Hauptversuche wurde deshalb die zweite Oxydation, natürlich auch das zweite Desamidieren, weggelassen und die Desaminoprotsäure als Analysenmaterial verwendet.

Hauptversuch.

1 kg Sericoin löste ich in 6 l 10%iger Natronlauge. Nach dem Erkalten verdünnte ich mit Wasser auf 25 l, oxydierte unter bekannten Bedingungen mit Ca-Permanganat, von dem $2^1/_2$ kg verbraucht wurden. Die vom Braunsteinschlamm abfiltrierte klare Flüssigkeit wurde mit 1 kg Ätzbaryt gekocht, der Überschuß sowie das gebildete Bariumoxalat abfiltriert, CO_2 eingeleitet, wieder abfiltriert, Essigsäure dazugegeben, stark eingeengt und neutralisiert. Ich fällte wieder mit Mercuriacetat, wobei jedoch große Mengen anorganischer Salze mitgerissen wurden. Davon zeugten auch die Analysenzahlen:

N-Bestimmung.

a) Einwage: 0,9138 g verbrauchten 12,5 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = **1,91%** N.
b) " 0,8904 g " 12,6 " $^n/_{10}$-H_2SO_4 = **1,98%** N.

Ich mußte also das gesamte Analysenmaterial reinigen. Zu diesem Zwecke wurde das Quecksilbersalz gründlich in wässeriger Suspension mit H_2S zersetzt, der Überschuß des H_2S durch einen Luftstrom entfernt und die vom HgS abfiltrierte klare Flüssigkeit von schöner goldgelber Farbe zunächst auf ihre Reaktionen geprüft. Sie reagierte stark sauer, gab keine Biuretreaktion mehr, war durch Phosphorwolframsäure in sauerer Lösung fällbar; Mercuriacetat fällte einen voluminösen Niederschlag, Bleiacetat, Bleiessig sowie auch Silbernitrat fällten nicht. Obwohl dies bereits für die Einheitlichkeit der organischen Substanz sprach, wurde mit Mercuriacetat in zwei Fraktionen gefällt. In einem aliquoten Teile wurde die Gesamtmenge des zur Fällung erforderlichen Hg-Acetates ermittelt, die Hauptmenge der Flüssigkeit dann mit der Hälfte gefällt, das klare Filtrat des Hg-Niederschlages nach dem Neutralisieren mit NaOH vollständig mit Hg-Acetat ausgefällt. Beide Fraktionen wurden nun bei 90 bis 100° zur Gewichtskonstanz getrocknet; sowohl in der A- als auch in der

B-Fraktion dann eine Stickstoff- und eine Quecksilberbestimmung durchgeführt.

N-Bestimmung:

A-Fraktion: Einwage: 1,255 g verbrauchten 27 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,01 $^0/_0$N.

N-Bestimmung:

B-Fraktion: Einwage: 1,1284 g verbrauchten 24,5 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,04 $^0/_0$N.

Hg-Bestimmung:

A-Fraktion: Einwage: 0,6298 g
0,5562 g HgS = 76,1 $^0/_0$ Hg.

B-Fraktion: Einwage: 1,1321 g
1,0177 g HgS = 77,46 $^0/_0$ Hg.

Es ist also trotz des um 1 $^0/_0$ differierenden Quecksilbergehaltes recht wahrscheinlich, daß wir es mit einer ziemlich einheitlichen Substanz zu tun haben. Es lag mir daher lediglich die Aufgabe ob, das Ausgangsmaterial für die Analysen in möglichst reiner Form herzustellen. Ich wollte zunächst eine Veresterung versuchen; diese mißlang jedoch, wahrscheinlich, weil die zur Veresterung benützte, durch Zersetzen des gesamten Hg-Salzes mit H_2S erhaltene, freie Säure nicht vollständig trocken zu gewinnen war. Hingegen gelang die Fällung der freien Säure aus alkoholischer Lösung mit alkoholischem Mercuriacetat sehr gut. Der Vorteil dieser Fällungsmethode war hauptsächlich darin gelegen, daß beim Aufnehmen der im Vakuum bei 50^0 zur Trockene gebrachten freien Säure in Alkohol der größte Teil der noch immer anwesenden anorganischen Salze (Natriumchlorid bildete einen großen Teil derselben) ungelöst zurückblieb und abfiltriert werden konnte. Auch ging die Fällung der im Alkohol sehr gut löslichen organischen Säure in alkoholischer Lösung viel glatter und quantitativer vor sich; speziell konnte ich mir diesmal die Zugabe von Natronlauge bei der Fällung vollständig ersparen; auch mußte ich keinen großen Überschuß an Mercuriacetat verwenden, wie er immer bei der Fällung aus wässeriger Lösung erforderlich ist. Das Hg-Salz, das, auf diese Weise gefällt, einen viel größeren Reinheitsgrad erwarten ließ, wurde nun auf einem Büchnerschen Filter gesammelt, mit H_2O bis zum Verschwinden der Hg-Reaktion gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz bei 90 bis 100^0 getrocknet. Die Ausbeute betrug 35 g.

C. Analysen der Desaminoprotsäure.

I. Elementaranalyse.

1. C- und H-Bestimmung.

Diese sowie auch alle folgenden Bestimmungen wurden nach den bereits beim Casein angeführten Methoden ausgeführt.

a) Einwage: 0,5333 g 0,157 g CO_2 = 8,02 % C
0,0508 g H_2O = 1,06 % H.

b) „ 0,5479 g 0,161 g CO_2 = 8,01 % C
0,0521 g H_2O = 1,06 % H.

2. N-Bestimmung.

a) Einwage: 1,0252 g Substanz verbraucht 24,8 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,38 % N
b) „ 0,3493 g „ „ 8,5 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,41 % N
c) „ 0,2886 g „ „ 7,0 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 3,40 % N

3. Hg-Bestimmung.

a) Einwage: 0,4531 g
0,3923 g HgS = 74,61 % Hg.

b) „ 0,6276 g
0,5443 g HgS = 74,73 % Hg.

II. Stickstoffverteilung.

1. Bestimmung der NH_2-Gruppen.

a) Nach der Methode von Donald van Slyke.

Einwage: 3,9969 g auf 200 ccm aufgefüllt:

a) 10 ccm gaben 7,7 ccm Stickstoff bei 21° und 751,5 mm = 2,16 % N
b) 10 „ „ 8,0 „ „ „ 24° „ 757,0 „ = 2,22 % N
c) 10 „ „ 7,8 „ „ „ 19° „ 758,0 „ = 2,23 % N
d) 10 „ „ 7,8 „ „ „ 19° „ 758,0 „ = 2,23 % N

b) Formoltitration.

Einwage: 3,9969 g auf 200 ccm aufgefüllt:

a) 20 ccm brauchen 6,4 ccm $^n/_{10}$-NaOH = 2,24 % N
b) 20 „ „ 6,2 „ $^n/_{10}$-NaOH = 2,17 % N

2. Basischer Stickstoff.[1])

a) Einwage: 1,7306 g verbrauchten 21,65 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,75 % N
b) „ 1,7306 g „ 21,65 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,75 % N
c) „ 2,5135 g „ 30,00 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4 = 1,67 % N

---

[1]) Durch Kochen der hydrolysierten Substanz im Vakuum, mit Magnesiumhydroxyd bei 50°, konnten nur kleine Mengen Ammoniak vertrieben werden, bei höherer Temperatur dagegen war die NH_3-Entwicklung beträchtlich. Um genau festzustellen, ob nicht doch ein Teil des als basischer Stickstoff angegebenen N als NH_3 vorlag, wollen wir bei einer ähnlichen Oxydation diesen Teil der Arbeit überprüfen.

3. Bestimmung des durch salpetrige Säure abspaltbaren Stickstoffes im basischen Stickstoff.

Die Diaminosäuren wurden zunächst in der hydrolysierten Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure gefällt, der Niederschlag gut gewaschen, in wenig H_2O suspendiert, durch Kochen in Lösung gebracht und in den Apparat einfließen gelassen.

Einwage: 0,3142 g gaben 9,4 ccm N bei 18° und 751 mm = **1,7 %** N.

4. Bestimmung der NH_2-Gruppen nach Hydrolyse.

a) Einwage: 0,17306 g gaben 9,9 ccm N bei 19° und 752 mm = **3,24 %** N
b) „ 0,12567 g „ 6,9 „ N „ 19° „ 753 „ = **3,12 %** N
c) „ 0,12567 g „ 7,5 „ N „ 21° „ 753 „ = **3,35 %** N

III. Bestimmung der Carboxylgruppen.

Einwage: 3,9969 g auf 200 ccm aufgefüllt:

a) 10 ccm verbrauchen in alkohol. Lösung mit Phenolphthalein als Indic. 6,3 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

b) 10 ccm verbrauchen in alkohol. Lösung mit Phenolphthalein als Indic. 6,3 ccm $^n/_{10}$-NaOH.

c) 10 ccm verbrauchen in H_2O-Lösung mit Phenolphthalein bei Zugabe von Formol 6,3 ccm $^n/_{10}$-NaOH entsprechend **14,18 %** COOH-Gruppen.

Da auch hier weder Oxalsäure noch Ammoniak vorhanden waren, ist die Reihe der Analysen abgeschlossen.

D. Chemische Charakteristik der erhaltenen Säure.

Zusammenstellung der Analysen.

Elementaranalyse	Mittel %	Zusammensetzung der freien Säure %
C 8,01 %, 8,02 % . . .	8,02	31,54
H 1,06 %, 1,06 % . . .	1,06	4,54
N 3,38 %, 3,41 %, 3,4 %	3,40	13,37
O	12,85	50,55
Hg 74,61 %, 74,73 % .	74,67	—
	100,00	100,00

COOH = 14,18 %.

N : O = 1 : 3,31, N : C : H : Hg = 1 : 2,75 : 4,28 : 1,53.

N : COOH = 1 : 1,3.

Stickstoffverteilung %	Mittel %
Gesamtstickstoff 3,38, 3,41, 3,4	3,40
Aminosäurenstickstoff 2,16, 2,22, 2,23, 2,23, 2,17, 2,24 .	2,21
NH-Gruppen-Stickstoff (Gesamt-N — Amino-N)	1,03
Basenstickstoff 1,75, 1,75, 1,67	1,72
NH_2-Stickstoff im Basen-N 1,7	1,70

$$\text{N : Amino-N : NH-Gruppen N : Basen-N} : \frac{\text{NH}_2\text{-Gruppen-N}}{\text{in Basen-N}} =$$
$$1 : 0{,}66 : 0{,}33 : 0{,}5 : 0{,}5$$

Im wesentlichen wurde also bei der Oxydation des Fibroins wieder eine hochoxydierte organische Säure gefunden, die in vielen Punkten denen, die bereits v. Fürth beschrieben, wie auch der von mir in vorliegender Arbeit beschriebenen ähnelt. Was ich besonders betonen möchte, ist der Umstand, daß diese Säure eine viel größere Garantie für ihre Reinheit und Einheitlichkeit zu bieten scheint als alle vorigen. Für ihre Einheitlichkeit, so weit von einer solchen bei einer hochmolekularen, kolloiden Substanz die Rede sein kann, spricht der Umstand, daß sie sowohl aus wässeriger als auch aus alkoholischer Lösung lediglich durch Mercuriacetat fällbar sich erwies, während sämtliche sonst gebräuchlichen Salze von Schwermetallen sie nicht zu fällen vermochten; außerdem ergab die Fällung in zwei Fraktionen bei beiden annähernd dieselben Werte von Stickstoff und Quecksilber. Die relative Reinheit der Substanz wurde durch dreimalige Umfällung, wovon die letzte aus Alkohol erfolgte, genügend garantiert. Besonders die Fällung aus Alkohol scheint mir sehr günstig und wäre wohl auch für spätere Fälle immer der aus wässeriger Lösung vorzuziehen.

Wie schon bemerkt, weist die analysierte Substanz in vielen wesentlichen Punkten große Ähnlichkeit mit der früher beschriebenen auf. Der hohe Sauerstoffgehalt, der teilweise durch den hohen Gehalt an Carboxylen bedingt ist, ist hier, so wie dort, mit dem niedrigeren Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt kombiniert. Der ebenfalls geringere Stickstoffgehalt ist in beiden Substanzen zum großen Teil in Form von durch salpetrige Säure abspaltbaren Aminogruppen vorhanden; nach der Hydrolyse wird dann der gesamte Stickstoff durch salpetrige Säure abgespalten. Diaminosäuren weisen ebenfalls beide Säuren auf, allerdings die zweite in bedeutend höherem Maße.

Ich will nun zur kurzen Charakteristik des aus Fibroin erhaltenen Produktes übergehen. Was vor allen bemerkenswert ist, ist das Fehlen der Biuretreaktion. Es scheint hier also ein weitgehenderer Spaltungsvorgang sich vollzogen zu haben. Es ist dies weiter nicht verwunderlich, da ja das Fibroin im allgemeinen einer der einfachsten Eiweißkörper ist. Außerdem scheint durch das Umfällen des Fibroins mit Salzsäure und Alkohol die leichte Spaltbarkeit noch zugenommen zu haben (insofern ich bei einer andern Arbeit, die unter denselben Bedingungen vor sich ging, nur mit dem Unterschiede, daß intaktes Fibroin zur Oxydation verwendet wurde, eine Substanz erhielt, die noch schöne Biuretreaktion gab).

Aus den Analysen sehen wir ferner, daß die Oxydation hier viel weiter fortgeschritten ist, und das Verhältnis N : O einerseits und N : COOH andererseits sich wesentlich zugunsten des Sauerstoffes und der COOH-Gruppen verschoben hat. Wenn wir früher annahmen, daß sämtliche unverketteten Seitenketten zu Carboxylgruppen oxydiert wurden, müssen wir hier notwendig das Vorhandensein von zweibasischen Säuren annehmen, da sonst für das Plus an Carboxylgruppen keine genügende Erklärung vorhanden wäre. Das Vorhandensein der zweibasischen Säuren würde auch den großen Gehalt an Sauerstoff erklärlich machen. Es müßten dann aber wohl sämtliche Glykokollkomplexe abgespalten sein, da dieselben ja keine oxydablen Seitenketten besitzen.

Am beachtenswertesten bei der vorliegenden Säure ist aber wohl der Gehalt an durch salpetrige Säure abspaltbarem Stickstoff und an durch Phosphorwolframsäure fällbarem.

Der hohe Gehalt an basischem Stickstoff, an van Slyke-Stickstoff und an Carboxylen könnte — unter Anlehnungen an das früher mitgeteilte Verkettungsschema — durch einen hohen Gehalt an stark verzweigten, kurzen, carboxylreichen Ketten, sowie an Diaminosäuren, deren NH_2-Gruppen teils frei, teils gebunden zu denken wären, erklärt werden.

Der hohe Gehalt an basischem Stickstoff (50 % des Gesamtstickstoffes) ist auch in anderer Hinsicht sehr bemerkenswert. Fibroin enthält wenige Prozent Diaminosäuren, deren Stickstoff einen verschwindend kleinen Prozentsatz des Gesamt-

stickstoffes des Fibroins ausmacht. Hier hat also eine kolossale Anreicherung an Diaminosäuren stattgefunden, und es liegt die Vermutung nahe, daß wir es hier mit einer Art von Kernsubstanz zu tun haben. Sie müßte hauptsächlich aus zweibasischen Säuren und Diaminosäuren bestehen; die Seitenketten wären dann durch die Oxydation zerstört worden.

Es ergibt sich hier eine bemerkenswerte Analogie zu den bekannten Vorstellungen Kossels, denen zufolge die Bildung der Protamine in den Testikeln bei der Samenreife derart erfolgt, daß Monoaminokomplexe nach und nach aus den Eiweißkörpern abgespalten werden, während basenreiche Reste zurückbleiben. Doch bedarf gerade dieser Punkt noch dringend weiterer eingehender Untersuchungen, um so mehr, als es sich gezeigt hat, daß die Hauptmenge des basischen Stickstoffs nach Säurehydrolyse zwar nicht als Ammoniak (Magnesiadestillation im Vakuum bei niederer Temperatur), wohl aber in so labiler Form erscheint, daß Magnesiadestillation bei gewöhnlichem Drucke denselben in Form von Ammoniak abspaltet.

Die nächste Aufgabe auf diesem Gebiete liegt nun darin, eine vollständige Hydrolyse einer Säure dieser Art unter Anwendung der E. Fischerschen Veresterungsmethode durchzuführen. Ich hoffe, daß ich selbst Gelegenheit haben werde, mich dieser Aufgabe zu unterziehen.

Oxydativer Abbau eines synthetischen Tripeptides.

Von

Otto Eisler.

(Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Prof. Dr. Otto v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 8. April 1913.)

Im Anschlusse an vorstehende Mitteilung erschien es uns im Interesse einer systematischen Durcharbeitung des Problems des oxydativen Abbaues der Eiweißkörper erwünscht, festzustellen, in welcher Weise die Oxydation eines synthetischen Polypeptides einsetzt. Als erster Schritt in dieser Richtung liegt eine Untersuchung von Leo Pollak aus Hofmeisters Laboratorium vor (Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 17, 1905), der ein Glycyl-glycin der Oxydation unterworfen und daraus der Erwartung gemäß Oxalylaminoessigsäure

$$\begin{array}{l} CO.COOH \\ | \\ NH.CH_2.COOH \end{array}$$

erhalten hatte. Als ein weiterer Schritt in dieser Richtung wurde die Oxydation des Alanyl-glycyl-glycins in Angriff genommen.

Darstellung des Ausgangsmaterials.

Das Alanyl-glycyl-glycin wurde nach der Methode von Emil Fischer dargestellt.

100 g Glykokollesterchlorhydrat wurden mit 50 ccm H_2O übergossen, mit einer Eissalzmischung auf -5^0 abgekühlt und unter kräftigem Rühren im Laufe einer Stunde 57,2 ccm 11,5n-NaOH langsam zugetropft; dabei stieg die Temperatur nicht über -5^0. Es wurde nun bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen; schon nach wenigen Stunden begann sich das Glycinanhydrid krystallinisch abzuscheiden; nach 24 Stunden war die Abscheidung des Anhydrids vollendet; es wurde nun abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute betrug 17 g.

17 g des Glycinanhydrids wurden in 75,7 ccm 2n-NaOH gelöst und bei gewöhnlicher Temperatur in einer Schüttelflasche 15 Minuten stehen gelassen. Nach dieser Zeit war das Anhydrid gespalten. Es wurde in eine Eismischung gestellt und in 10 Portionen 34,2 g d-l-Brompropionylbromid abwechselnd mit 84,2 ccm 2n-NaOH hinzugefügt. Dann wurde mit 34 ccm 5n-HCl neutralisiert und stehen gelassen. Nach einiger Zeit schied sich das Brompropionyl-glycyl-glycin krystallinisch ab; es wurde abfiltriert, die Mutterlauge zur Trockne gedampft, mit Essigäther extrahiert, der Essigätherauszug eingeengt, wobei man eine zweite Krystallisation erhielt. Ausbeute des trockenen Produktes betrug 25 g.

$$CH_3.CHBr.COBr + NH_2.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH =$$
$$= CH_3.CHBr.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH + HBr.$$

25 g des Bromkörpers wurden mit 125 ccm 25%igen Ammoniaks in einer gut verschlossenen Stöpselflasche 3 Tage lang bei einer Temperatur von 37° stehen gelassen. Das Ganze wurde dann im Vakuum zur Trockne gedampft, mit absolutem Alkohol übergossen, noch einmal zur Trockne gebracht, hierauf in 15 ccm warmen Wassers aufgenommen und Alkohol bis zur bleibenden Trübung dazugesetzt. Nach einigen Stunden fiel das Tripeptid schön krystallinisch aus; es wurde auf dieselbe Weise umkrystallisiert und bei 105° im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug 14 g.

$$CH_3.CHBr.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH + NH_3 =$$
$$= CH_3.CH.NH_2.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH + HBr.$$

Identifiziert wurde das Produkt durch Ausführung der Schmelzpunktbestimmung (Schmelzpunkt = 240°) und durch eine N-Bestimmung:

Einwage: 0,2785 g, verbrauchen 40,7 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.
Daraus gefunden: N = 20,48%.
Berechnet: 20,69%.

Erster Oxydationsversuch.

Ich versuchte zunächst, die Oxydation derartig zu leiten, um etwa zu dem Produkt

$$COOH.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH$$

zu gelangen. Zu dieser Oxydation wären 5 O erforderlich. Oxydiert wurde mit Calciumpermanganat, dessen Titer genau mit Oxalsäure gestellt wurde.

4,5 g des Tripeptids wurden in 50 ccm H_2O gelöst und unter Eiskühlung 104,35 ccm einer Ca-Permanganatlösung zutropfen gelassen (1 ccm der Permanganatlösung entspricht 0,01698 g O in alkalischer Lösung). Es wurde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Entfärbung trat sehr langsam ein; nach 48 Stunden hatte sich aber doch über dem gebildeten Braunsteinschlamme eine wasserklare Flüssigkeit abgeschieden. Es

wurde der Braunsteinschlamm abgenutscht und zweimal mit Wasser ausgekocht. Die vereinigten Filtrate bildeten eine wasserklare Flüssigkeit von neutraler Reaktion, aus der durch Kohlensäure kein Calciumcarbonat ausfiel, die jedoch mit Ammonoxalat einen Niederschlag von Ca-Oxalat gab. Die Flüssigkeit gab auch keine Biuretreaktion. Sie wurde nun im Vakuum bei einer Temperatur des Wasserbades, die 40^0 nicht überstieg, stark eingeengt, wobei sie eine violettrote Färbung annahm. Das klare Destillat enthielt Ammoniak. Das Reaktionsprodukt wurde nun mit Alkohol bis zur bleibenden Trübung versetzt; eine Krystallisation war aber auch nach mehrtägigem Stehen nicht zu bemerken. Es wurde ein großer Überschuß von Alkohol hinzugefügt, die in rötlichen amorphen Klumpen ausgefallene Substanz abfiltriert, in heißem Wasser unter Zugabe von Tierkohle gelöst, noch einmal mit Alkohol gefällt, die Lösung in heißem H_2O unter Zusatz von Tierkohle wiederholt. Jetzt war die Flüssigkeit wieder farblos geworden und die rote Farbe verschwunden. Beim Stehen im Vakuum über Schwefelsäure bei gewöhnlicher Temperatur begann nun die Substanz langsam zu krystallisieren. Es wurde auf diese Weise bis auf wenige Kubikzentimeter eingeengt, die Krystallmasse abfiltriert, mit eiskaltem H_2O gewaschen und im Vakuum über H_2SO_4 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 0,53 g einer in schönen, tetraederartigen, jedoch stark doppelbrechenden Gebilden krystallisierenden Substanz, die zweifellos ein Calciumsalz einer organischen Säure darstellte. Die Substanz schmolz unter Zersetzung bei 285^0.

Bevor ich zu den Analysen übergehe, möchte ich kurz die Behandlung der Mutterlauge erwähnen, die noch viel Substanz enthielt. Da dieselbe nicht in der vorliegenden Form zum Krystallisieren gebracht werden konnte, wurde sie zunächst mit Mercuriacetat gefällt, der weiße, amorphe Niederschlag in wässeriger Suspension mit H_2S zersetzt und die von H_2S befreite, sauer reagierende Flüssigkeit mit Kupfercarbonat gekocht. Ich erhielt eine blau gefärbte, neutral reagierende Flüssigkeit, aus der jedoch nur ein kleiner Teil (0,1 g) krystallinisch zu erhalten war; die Menge genügte also bei weitem nicht zu Analysen.

Analysen des erhaltenen Calciumsalzes.

Die C-, H-, und N-Bestimmung ließ ich, da ich bei der geringen Menge an Analysensubstanz nicht sämtliche Bestimmungen hätte ausführen können, im Laboratorium des Herrn Dr. S. Edelbacher in Innsbruck nach dem von Pregl ausgearbeiteten Mikroanalysenverfahren

ausführen. Das Krystallwasser wurde durch Trocknen der Substanz durch mehrere Stunden bei einer Temperatur von 120° bestimmt, das Calcium nach dem Veraschen der Substanz unter Zugabe von H_2SO_4 als $CaSO_4$ ausgewogen.

C- und H-Bestimmung:

a) Einwage: 6,35 mg
2,27 „ H_2O = 4,05% H,
4,41 „ CO_2 = 18,94% C.

b) Einwage: 6,95 „
2,40 „ H_2O = 3,87% H,
4,80 „ CO_2 = 18,83% C.

N-Bestimmung:

a) Einwage: 3,35 mg geben 0,337 ccm N bei 711 mm u. 18° = 11,04% N.
b) Einwage: 3,82 „ „ 0,387 „ „ „ 711 „ „ 18° = 11,11% N.

Ca-Bestimmung:

Einwage: 0,1070 g
0,0453 „ $CaSO_4$ = 12,45% Ca.

H_2O-Bestimmung:

Einwage: 0,0739 g
0,0180 „ H_2O = 24,35% H_2O.

Diese Werte geben kein eindeutiges Resultat. Noch am ehesten würde es sich um die Substanz $C_6H_5N_3O_7Ca + 6\,H_2O$ handeln. Diese ergibt folgende Analysenzahlen:

	Berechnet für $C_6H_5N_3O_7Ca + 6\,H_2O$ %	Gefunden %	
C	18,99	18,94	18,83
H	4,48	4,05	3,87
N	11,04	11,04	11,11
Ca . . .	10,50	12,45	
O	54,99	—	
H_2O . . .	28,40	24,35	

Bei guter Übereinstimmung der C-, H- und N-Resultate differieren die Werte für Ca und H_2O beträchtlich. Da die H_2O-Bestimmung nur bei einer Temperatur von 120° vorgenommen wurde, ist es wohl möglich, daß das Krystallwasser zu seiner Entfernung einer viel höheren Temperatur bedarf, da ja, wie bekannt, speziell die Erdalkalisalze organischer Säuren für ihre Krystallwasserbestimmung eine sehr hohe Temperatur erfordern. Was das Plus bei der Ca-Bestimmung anlangt, so dürfte es sich um ein anhaftendes anorganisches Natriumsalz handeln, da ich bei der Oxydation, um dieselbe zu beschleunigen, Natronlauge zugegeben hatte. Zu einer Wieder-

holung der beiden fraglichen Bestimmungen fehlte es an Material; ich unternahm daher einen zweiten Oxydationsversuch.

Zweiter Oxydationsversuch.

9 g des Alanyl-glycyl-glycins wurden wieder unter Eiskühlung mit 334,5 ccm Ca-Permanganat versetzt (1 ccm Permanganat entspricht 0,01698 g Sauerstoff); es ist dies die für 8 Sauerstoffe erforderliche Menge Permanganat, da das vermutlich bei der ersten Oxydation erhaltene Produkt anscheinend diese Menge an Sauerstoff zu seiner Entstehung erfordert. Nach 48 Stunden war die Entfärbung wieder vollzogen, die vom Braunsteinschlamme abfiltrierte klare Flüssigkeit, die dieselben Reaktionen aufwies wie die analoge frühere, wurde im Vakuum zur Trockne gedampft; sie färbte sich wieder rot. Sie wurde in wenig heißem H_2O unter Zusatz von etwas Tierkohle gelöst; beim Erkalten fiel sie bereits krystallinisch aus. Die noch zweimal auf dieselbe Weise umkrystallisierte Substanz wurde im Vakuum über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Ausbeute betrug 1,8 g; die Krystalle glichen den vorigen in hohem Grade, wiesen tetraederähnliche Formen auf und zeigten sich stark doppelbrechend. Zersetzungspunkt wieder bei 285°. Es war also sehr wahrscheinlich, daß dasselbe Produkt wie früher vorlag. Diese Vermutung wurde durch die Analysen sichergertellt.

C- und H-Bestimmung:

Die Bestimmungen wurden von mir nach Liebig ausgeführt, die Substanz im Schiffchen mit Kaliumbichromat gemischt.

a) Einwage: 0,1502 g
0,0541 g H_2O = **4,02**% H,
0,1062 g CO_2 = **19,28**% C.

b) Einwage: 0,1002 g
0,0381 g H_2O = **4,25**% H,
0,0693 g CO_2 = **18,86**% C.

N-Bestimmung:

Es wurden zwei N-Bestimmungen ausgeführt, die erste nach Kjeldahl, die zweite in der durch 6 Stunden am Rückflußkühler mit konzentrierter HCl gekochten Substanz durch Abspaltung des Stickstoffs mit salpetriger Säure im Apparate nach van Slyke.

a) Einwage: 0,0778 g verbrauchten 5,85 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 = **10,53**% N.

b) Einwage: 0,02957 g Substanz geben 5,8 ccm N bei 22° und 756 mm = **10,99**% N.

Ca-Bestimmung:

a) Einwage: 0,0457 g
0,0164 g $CaSO_4$ = **10,56** % Ca.

b) Einwage: 0,1028 g
0,0374 g $CaSO_4$ = **10,70** % Ca.

H_2O-Bestimmung.

Die H_2O-Bestimmung wurde durch Trocknen der Substanz zur Gewichtskonstanz bis zu einer Temperatur von 180° ausgeführt, nachdem vorher die Substanz nach dem Trocknen bei 120° gewogen wurde.

a) Einwage: 0,1641 g
0,0461 g H_2O = **28,09** % H_2O.

b) Einwage: 0,0778 g
0,0223 g H_2O = **28,66** % H_2O.

Bei der ersten Einwage betrug das H_2O, das bei einer Temperatur von 120° entwichen war, 0,0395 g, was einem Prozentgehalte von 23,98 % H_2O entsprechen würde.

Oxalsäurebestimmung.

Die Substanz wurde durch 6 Stunden am Rückflußkühler mit rauchender Salzsäure gekocht, nachher Calciumchlorid hinzugefügt, mit Ammoniak übersättigt, mit Essigsäure angesäuert und das ausgeschiedene Calciumoxalat nach Überführung in Calciumsulfat gewogen.

a) Einwage: 0,0886 g
0,0577 g $CaSO_4$ = **43,26** % Oxalsäure.

b) Einwage: 0,1330 g
0,0925 g $CaSO_4$ = **46,20** % Oxalsäure.

Zusammenstellung der Resultate.

	Produkt I	Produkt II	Mittel	Berechnet für $C_6H_5O_7N_3Ca + 6H_2O = C_6H_{17}O_{13}N_3Ca$ %	Berechnet für $C_6H_3O_8N_3Ca + 5H_2O = C_6H_{13}O_{13}N_3Ca$ %
C	18,94 18,83	18,86 19,28	18,98	18,98	19,20
H	4,05 3,87	4,03 4,25	4,05	4,52	3,47
N	11,04 11,11	10,53 10,99	10,92	11,08	11,20
O	—	—	55,42	54,85	55,46
Ca	—	10,70 10,56	10,63	10,57	10,67
			100,00	100,00	100,00
H_2O bei 120°	24,35	23,98	**24,16**	—	**24,00**
H_2O bei 180°	—	28,09 28,66	28,38	28,50	—
Oxalsäure	—	46,20 43,26	44,73	23,68 (für 1 Mol.) 47,37 (für 2 Mol.)	48,00 (2 Moleküle)

Für die Erklärung unserer Resultate kommen in ungezwungener Weise 2 Deutungen in Betracht.

A. Die Oxydation könnte nach folgender Gleichung verlaufen sein:

$$\underset{\displaystyle CH_3}{NH_2.CH}.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2COOH + 8O + Ca(OH)_2$$

$$= \left.\begin{matrix} NH_2.CH.CO—NH.CO.CO—NH.COO \\ | \\ COO\text{—————————————————} \end{matrix}\right| Ca + CO_2 + 5\,H_2O$$

Nun ist es aber klar, daß eine solche Verbindung $C_6H_7O_7N_3$ bei der hydrolytischen Spaltung, unter Zerfall in NH_3, CO_2, Oxalsäure und Glykokoll, je 1 Molekül entsprechend nur 1 Molekül Oxalsäure liefern könnte:

OH	H	OH	H		
NH_2.CH.CO —	—NH.	CO.CO —	—NH.	COO	H
COO H	H	OH			

Nun ergeben aber unsere Analysen, die in allen anderen Punkten mit dieser Formel vortrefflich übereinstimmen, in bezug auf die bei der Hydrolyse abspaltbare Oxalsäuremenge insofern eine sehr wesentliche Abweichung, als je 1 Molekül des oxydierten Tripeptids entsprechend nicht 1, sondern 2 Moleküle Oxalsäure zum Vorschein kommen. Es drängt uns dies dazu, eine andere Erklärungsmöglichkeit für unsere Befunde zu suchen.

b) Man könnte annehmen, daß gleichzeitig mit dem Oxydationsvorgange eine intramolekulare Umlagerung in dem Sinne stattgefunden habe, daß an dem ursprünglichen Alaninkomplex der Stickstoff aus einer amid- in eine imidartige Bindung übergegangen ist:

$$\underset{\displaystyle CH_3}{NH_2.CH}.CO—NH.CH_2.CO—NH.CH_2.COOH + 10O + Ca(OH)_2$$

$$= \left.\begin{matrix} NH.CO.CO—NH.CO.CO—NH.COO \\ | \\ COO\text{—————————————————} \end{matrix}\right| Ca + CO_2 + 6\,H_2O$$

Die Verbindung $C_6H_5N_3O_8$ würde bei der hydrolytischen Spaltung

	H	OH OH	H	OH	H		
	NH.	CO.CO—	—NH.	CO.CO—	—NH.	COO	H
COO	H		H	OH			

glatt in NH_3, CO_2 und Oxalsäure zerfallen, und zwar würde dieselbe je 1 Molekül entsprechend 2 Moleküle Oxalsäure liefern.

Wir möchten eine definitive Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten weiteren Untersuchungen, die sich auch auf kompliziertere Polypeptide zu beziehen hätten, vorbehalten und das Resultat der vorliegenden Untersuchungen dahin zusammenfassen, daß das Alanyl-glycyl-glycin bei der Oxydation mit Calciumpermanganat unter Aufnahme von 8 bzw. 10 Sauerstoffatomen in eine schön krystallisierende, schwer lösliche Calciumverbindung von der Zusammensetzung

$$\begin{array}{l} NH_2.CH.CO—NH.CO.CO—NH.COO \\ \quad\;\; | \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad | \\ \quad COO ———————————— Ca \end{array}$$

oder von der Zusammensetzung

$$\begin{array}{l} \quad /CO.CO—NH.COO\backslash \\ NH \qquad\qquad\qquad\qquad\quad >Ca \\ \quad \backslash CO.CO—NH.COO/ \end{array}$$

übergeht. Die letztere wäre als das Ca-Salz des Imid der Oxalcarbaminsäure

$$\begin{array}{l} CO—NH.COOH \\ | \\ COOH \end{array}$$

aufzufassen, deren Amid, die Oxalursäure

$$\begin{array}{l} CO—NH.CO.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

als Bestandteil des normalen Harnes und als Produkt der Eiweißoxydation physiologisch in Erscheinung tritt; sie würde auch zum Oxalursäureamid (Oxalan),

$$\begin{array}{l} CO—NH.CO.NH_2, \\ | \\ CONH_2 \end{array}$$

das von Kutsher, Schenk, Zickgraf und Seemann[1]) durch Einwirkung von Calciumpermanganat auf Eiweißstoffe erhalten worden ist, in naher Beziehung stehen.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **41**, 259, 1904; **44**, 229, 1905; Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 2928, 1904.

Über den Chlorgehalt des Blutes und seine Verteilung auf Serum und Blutkörperchen.

Ein Beitrag zur Frage der Permeabilität der roten Blutkörperchen für anorganische Substanzen.

Von

J. Snapper.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 8. April 1913.)

Seitdem Hamburger das Permeabilitätsproblem der roten Blutkörperchen auf die Tagesordnung gestellt hat[1]), ist über die Durchlässigkeit dieser Zellen für anorganische Bestandteile, wie es scheint, noch keine Übereinstimmung erzielt. Weder die vielen direkten Analysen Hamburgers[2]) noch die vielen indirekten Argumente Loebs[3]) sind imstande gewesen, jedermann zu überzeugen, denn noch in der jüngsten Zeit findet man in der Literatur Angaben, die die Permeabilität der roten Blutkörperchen für nichtlipolytische Substanzen nicht anerkennen.

Zu den Argumenten, deren sich die Gegner der Permeabilität für anorganische Substanzen immer bedienen, gehört der Unterschied im Gehalt an Aschenbestandteilen des Serums und der Blutkörperchen. Denn — wird gesagt — wäre ein freier Austausch für die anorganischen Stoffe möglich, so fehlte doch ein Grund, warum dieser Unterschied bestehen sollte. Dagegen wird von der anderen Seite bemerkt, daß ein Teil dieser anorganischen Verbindungen in nichtdiffusibler Bindung, d. h. also an Eiweiß gebunden, im Serum vorhanden sein muß. Weiter

---

[1]) Hamburger, Zeitschr. f. Biol. 1889, 414. — Derselbe, Osmotischer Druck und Ionenlehre, Bd. I, S. 206ff.

[2]) Hamburger, Arch. internat. de Physiol. 10, 1, 1911.

[3]) Loeb, diese Zeitschr. 47, H. 2, 1912.

bedenke man, daß es sich hier um ein kompliziertes chemisches Gleichgewicht handelt, das es verständlich macht, daß innerhalb der Zelle die Konzentration eines Ions nicht notwendig dieselbe zu sein braucht wie außerhalb.

Hamburger hat durch direkte quantitative Analyse eine Permeabilität z. B. von Chlor nachweisen können. Diese Permeabilität tritt besonders klar hervor, wenn man dem Blute CO_2 hinzufügt[1]). Höber[2]) hat demgegenüber angeführt, daß diese Permeabilität nur dann besteht, wenn die Blutkörperchen mit CO_2 beladen sind, während mit dem Austreiben dieses Gases die Durchlässigkeit wieder schwindet. Diese Auffassung ist entschieden unrichtig. Direkte Analysen haben gezeigt, daß auch bei nicht mit CO_2 behandelten Blutkörperchen Chlor hindurchtritt.

Eine schöne Bestätigung des Durchtritts anorganischer Substanzen durch physiologisch normale Zellen findet man in den Resultaten der quantitativen Phagocytose-Versuche[3]).

Es sei jetzt erlaubt, hier noch ein Argument für die Permeabilität der roten Blutkörperchen anzuführen, ein Argument, das in direktem Zusammenhange steht zu dem angeblichen Unterschied zwischen dem Gehalt an Aschenbestandteilen von Blutkörperchen und Serum.

In einer Arbeit, die eigentlich ein anderes Ziel hatte, wurde untersucht, ob im Serum nichtdiffusible Chlorverbindungen zu finden waren. Wie allgemein bekannt, haben Bugarszky und Liebermann[4]) ein Albuminchlorid herstellen können. Es wäre also theoretisch nicht unmöglich, daß eine derartige Substanz auch im Serum vorhanden wäre. Bis vor kurzem war diese Frage durch direkte Analyse nicht näher untersucht worden. Erst vor zwei Jahren ungefähr hat Rona[5]) in einer Reihe von Untersuchungen mit der Kompensationsdialyse gezeigt, daß das Gesamt-Chlor in diffusibler Bindung vorhanden ist. Das Chlor wäre also eine Substanz, für die die

---

[1]) Hamburger, l. c.

[2]) Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, 1911, S. 258.

[3]) Hamburger, Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagocyten, 1912.

[4]) Bugarszky und Liebermann, Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 1898.

[5]) Rona, diese Zeitschr. 29, 501, 1910.

Annahme, daß ein Teil der anorganischen Substanzen in nichtdiffusibler Bindung im Serum vorhanden ist, nicht zulässig wäre.

Wir haben der Wichtigkeit dieser Ronaschen Angabe wegen diese Frage noch einmal mit einer anderen Methode nachgeprüft. Im Jahre 1898 hat Hamburger[1]) gezeigt, daß, wenn man das Serum mit der doppelten Quantität Alkohol fällt, alle diffusiblen Verbindungen in den Alkoholextrakt gehen, während die nichtdiffusiblen Eiweißverbindungen in dem Niederschlage bleiben.

Er hat damals diese Tatsache für das diffusible und nichtdiffusible Alkali näher untersucht und fand mittels seiner Alkoholmethode dieselben Werte, die mittels der Dialysemethode[2]) bei der Kontrolle aufgefunden wurden. Diese Alkoholmethode haben wir zur Nachprüfung der Frage benutzt, ob das Chlor auch in nichtdiffusibler Bindung im Serum aufzufinden wäre.

Das Resultat ist, daß wir dem Ronaschen Schluß in jeder Hinsicht beipflichten können.

Wenn man das Serum von Mensch, Pferd, Kuh oder Hund mit der doppelten oder dreifachen Quantität Alkohol fällt, so findet man das Gesamt-Chlor im Filtrat wieder, während in dem Niederschlag absolut kein Chlor mehr aufzufinden ist. Auch wenn man zum Serum eine gewisse Quantität NaCl zusetzt, gilt dasselbe; auch dann findet man die Totalquantität des Chlors (des Serums und des Zusatzes) in dem Alkohol, und nichts in dem Präcipitat. Weil im Alkohol kein Eiweiß löslich ist und das gesamte NaCl des Serums sich wohl in Alkohol löst, ist also kein NaCl des Serums an Eiweiß gebunden.

Es fragt sich jetzt, inwieweit hier das Postulat der Gegner der Permeabilität für anorganische Substanzen, d. h. eine gleiche Quantität Chlor im Serum und in den Blutkörperchen, erfüllt sei. In dieser Hinsicht werden gewöhnlich die alten Abderhaldenschen Analysen[3]) angeführt, die für den Chlorgehalt der roten Blutkörperchen nur 30$^0/_0$ von dem Gehalt des Serums angeben Wir haben diese Angabe bei Mensch und Hund nachgeprüft.

In einem Teil der Fälle wurde der Chlorgehalt 1. von Blut, 2. von Serum und 3. von den Blutkörperchen (mit Glucose ausgewaschen)

---

[1]) Hamburger, Arch. f. [Anat. u.] Phys. 1898.

[2]) Vgl. Loewy und Zuntz, Arch. f. d. ges. Physiol. 58, 1894.

[3]) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 106, 1898.

einer bestimmten Quantität Blut bestimmt. Aus diesen drei Zahlen ergab sich das Verhältnis von Blutkörperchen zu Serum, und hieraus war wieder der Chlorgehalt von 1 l Blutkörperchen zu berechnen.

Der Chlorgehalt von z. B. 20 ccm Blut wird bestimmt, nachdem das Serum abpipettiert und die Blutkörperchen dreimal mit isotonischer Glucoselösung ausgewaschen sind. In eine Glucoselösung treten, wie bekannt, keine Substanzen aus den Blutkörperchen über.

In einer Reihe anderer Fälle wurde nur der Chlorgehalt von Blut und Serum bestimmt, während mit dem Hämatokrit bestimmt wurde, wieviel Volumprozente Blutkörperchen in einer bestimmten Quantität Blut vorhanden waren. Hieraus war der Chlorgehalt der Blutkörperchen von 1 l Blut zu berechnen, und hiernach der Chlorgehalt von 1 l Blutkörperchen.

Alle Chloranalysen wurden in folgender Weise angestellt[1]: Zum Serum oder Blut wird reichlich Salpetersäure zugesetzt. Danach fügt man so viel $AgNO_3$ zu, daß alles Chlor in AgCl umgesetzt ist. Der Kolben wird dann erwärmt unter fortwährendem Zusatz von krystallisiertem Kaliumpermanganat. Dies wird so lange fortgesetzt, bis die braune Farbe der Flüssigkeit nicht mehr verschwindet. Zur kochenden Lösung wird dann so viel Oxalsäure zugesetzt, bis die Flüssigkeit entfärbt ist. Nach Abkühlung wird nach Volhard zurücktitriert.

Es zeigte sich jetzt merkwürdigerweise, daß das Verhältnis zwischen Chlorgehalt des Serums und der Blutkörperchen ungefähr konstant war, jedenfalls immer um denselben Wert herum schwankte. Sowohl beim Menschen wie beim Hunde war dieser Mittelwert 40%.

Dies ergibt sich nach den folgenden Bestimmungen:

I. Hund. 1 l Serum enthält 3890 mg Chlor.
1 l Blut „ 2850 „ „

Die Blutkörperchen von 1 l Blut enthalten 750 mg Chlor. Nehmen wir an, in dem Blut befindet sich x% Serum.

$$x \times 3890 + 750 = 2850.$$

$$x = \frac{2850 - 750}{3890} = 54\%.$$

In 1 l Blut befinden sich also 540 ccm Serum und 460 ccm Blutkörperchen.

460 ccm Blutkörperchen enthalten 750 mg Chlor.

1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{100}{46} \times 750 = 1630 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1630}{3890} = 42\%.$$

---

[1] Diese Methode ist von Korányi beschrieben (Zeitschr. f. klin. Med. 32). Der Oxalsäurezusatz ist eine Modifikation, die Dr. Visser in Groningen ausgedacht hat.

II. Hund. 1 l Serum enthält 4132 mg Chlor.
1 l Blut „ 3160 „ „

Die Blutkörperchen von 1 l Blut enthalten 626 mg Chlor.
Nehmen wir an, in dem Blut befindet sich $x\,\%$ Serum.

$$x \times 4132 + 626 = 3160.$$

$$x = \frac{3160 - 626}{4132} = \frac{2534}{4132} = \mathbf{61}\,\%.$$

1 l Blut besteht also aus 610 ccm Serum und 390 ccm Blutkörperchen.

390 ccm Blutkörperchen enthalten 626 mg Chlor.
1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{100}{39} \times 626 = 1600 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1600}{4132} = \mathbf{40}\,\%.$$

III. Hund. 1 l Serum enthält 4200 mg Chlor.
1 l Blut „ 3190 „ „

Die Blutkörperchen von 1 l Blut enthalten 820 mg Chlor.
Nehmen wir an, in dem Blut befindet sich $x\,\%$ Serum.

$$4200 \times x + 820 = 3190.$$

$$x = \frac{3190 - 820}{4200} = 56\,^1/_2\,\%.$$

1 l Blut enthält also 435 ccm Blutkörperchen.
1 l Blutkörperchen enthält also:

$$\frac{820 \times 1000}{435} = 1880 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1880}{4200} = \mathbf{44}\,\%.$$

IV. Hund. 1 l Serum enthält 4150 mg Chlor.
1 l Blut „ 3070 „ „

Mit dem Hämatokrit hatte sich herausgestellt, daß im Blut 54 % Serum und 46 % Blutkörperchen anwesend waren.

Nehmen wir an, der Chlorgehalt der Blutkörperchen eines Liters Blut ist x.

$$\frac{54}{100} \times 4150 + x = 3070.$$

$$x = 3070 - 2240 = 830.$$

460 ccm Blutkörperchen enthalten 830 mg Chlor.
1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{100}{46} \times 83 = 1805 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1805}{4150} = \mathbf{43}\,^1/_2\,\%.$$

V. Hund. 1 l Serum enthält 4230 mg Chlor.
1 l Blut „ 3070 „ „

Das Blut enthält 54 % Serum und 46 % Blutkörperchen.

Nehmen wir an, der Chlorgehalt der Blutkörperchen eines Liters Blut ist x.

$$\frac{54}{100} \times 4230 + x = 3070.$$

$$x = 3070 - 2280 = 790.$$

1 l Blutkörperchen enthält $\frac{790}{46} = 1730$ mg Chlor.

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1730}{4230} = 40\,{}^1/_2\,\%.$$

Für den Menschen ergaben derartige Bestimmungen:

I. Mensch. 1 l Serum enthält 3828 mg Chlor.
1 l Blut „ 2808 „ „

Die Blutkörperchen eines Liters Blut enthalten 606 mg Chlor.

Nehmen wir an, im Blut befindet sich x % Serum.

$$x \times 3828 + 606 = 2808.$$

$$x = \frac{2202}{3828} = 57\,{}^1/_2\,\%.$$

1 l Blut besteht also aus 570 ccm Serum und 43 % Blutkörperchen.

1 l Blutkörperchen enthält also:

$$\frac{100}{43} \times 606 = 1425 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1425}{3828} = 37\,\%.$$

II. Mensch. 1 l Serum enthält 3696 mg Chlor.
1 l Blut „ 2534 „ „

Die Blutkörperchen eines Liters Blut enthalten 607 mg Chlor.

Nehmen wir an, im Blut befindet sich x % Serum.

$$x \times 3696 + 607 = 2534.$$

$$x = \frac{1927}{3696} = 52\,\%.$$

In 1 l Blut befinden sich also 520 ccm Serum und 480 ccm Blutkörperchen.

1 l Blutkörperchen enthält also:

$$607 \times \frac{100}{48} = 1310 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1310}{3696} = 35\,{}^1/_2\,\%.$$

III. Mensch. 1 l Serum enthält 3620 mg Chlor.
1 l Blut „ 2610 „ „

Die Blutkörperchen von 1 l Blut enthalten 645 mg Chlor.

Nehmen wir an, im Blut befindet sich $x\,\%$ Serum.

$$x \times 3620 + 645 = 2610.$$

$$x = \frac{1965}{3620} = 54\,\%.$$

In 1 l Blut befinden sich 540 ccm Serum und 460 ccm Blutkörperchen.

1 l Blutkörperchen enthält also:

$$\frac{100}{46} \times 645 = 1400 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1400}{3620} = 38\tfrac{1}{2}\,\%.$$

IV. Mensch. 1 l Serum enthält 3840 mg Chlor.
1 l Blut „ 2840 „ „

Mit dem Hämatokrit war gefunden: 57 % Serum und 43 % Blutkörperchen.

Nehmen wir an, daß der Chlorgehalt der Blutkörperchen von 1 l Blut x ist:

$$\frac{57}{100} \times 3840 + x = 2840.$$

$$x = 2840 - 2190 = 650.$$

Also enthalten 430 ccm Blutkörperchen 650 mg Chlor.

1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{100}{43} \times 650 = 1510 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1510}{3840} = 39\tfrac{1}{2}\,\%.$$

V. Mensch. 1 l Serum enthält 3760 mg Chlor.
1 l Blut „ 2750 „ „

Mit dem Hämatokrit war gefunden: 54 % Serum und 46 % Blutkörperchen.

Nehmen wir an, der Chlorgehalt der Blutkörperchen von 1 l Blut ist x:

$$\frac{54}{100} \times 3760 + x = 2750.$$

$$2030 + x = 2750.$$

$$x = 720.$$

460 ccm Blutkörperchen enthalten 720 mg Chlor.

1 l Blutkörperchen enthalten:

$$\frac{100}{46} \times 720 = 1560 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1560}{3760} = 41\tfrac{1}{2}\,\%.$$

VI. Mensch. 1 l Serum enthält 3440 mg Chlor.
1 l Blut „ 2560 „ „

56 % Serum und 44 % Blutkörperchen.

Chlorgehalt der Blutkörperchen von 1 l Blut ist x.

$$\frac{56}{100} \times 3440 + x = 2560.$$

$$x = 2560 - 1930 = 630.$$

1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{100}{44} \times 630 = 1430 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1430}{3440} = 41\tfrac{1}{2}\%.$$

VII. Mensch. 1 l Serum enthält 3600 mg Chlor.
1 l Blut " 2720 " "

54% Serum; $45\tfrac{1}{2}$% Blutkörperchen.
Chlorgehalt der Blutkörperchen von 1 l Blut ist x.

$$\frac{545}{1000} \times 3600 + x = 2720.$$

$$x = 2720 - 1960 = 760.$$

1 l Blutkörperchen enthält:

$$\frac{1000}{455} \times 760 = 1670 \text{ mg Chlor.}$$

$$\frac{\text{Chlorgehalt Blutkörperchen}}{\text{Chlorgehalt Serum}} = \frac{1670}{3600} = 46\tfrac{1}{2}\%.$$

Tabelle.

Das Verhältnis des Chlorgehaltes der Blutkörperchen zu dem Chlorgehalt des Serums ist konstant und ungefähr 40%.

	Das Blut bestand aus Serum für: %	Chlorgehalt von 1 l Serum mg	Chlorgehalt von 1 l Blutkörperchen mg	Chlorgehalt Blutkörperchen / Chlorgehalt Serum
Hund				
1.	54	3890	1630	42
2.	61	4132	1600	39
3.	$56\tfrac{1}{2}$	4200	1880	44
4.	54	4150	1805	$43\tfrac{1}{2}$
5.	54	4230	1730	$40\tfrac{1}{2}$
Mensch				
1.	$57\tfrac{1}{2}$	3828	1425	37
2.	52	3696	1310	$35\tfrac{1}{2}$
3.	54	3620	1400	$38\tfrac{1}{2}$
4.	57	3840	1510	$39\tfrac{1}{2}$
5.	54	3760	1560	$41\tfrac{1}{2}$
6.	56	3440	1430	$41\tfrac{1}{2}$
7.	$54\tfrac{1}{2}$	3600	1670	$46\tfrac{1}{2}$

Die Bedeutung dieses konstanten Verhältnisses erhellt aus den folgenden Überlegungen.

Die in den Blutkörperchen enthaltene Chlormenge — muß man sich vorstellen — ist in der intraglobulären Flüssigkeit gelöst. Die Quantität dieser intraglobulären Flüssigkeit ist von Hamburger berechnet aus den Volumenschwankungen, die die roten Blutkörperchen unter dem Einfluß von verschiedenen hypotonischen NaCl-Lösungen zeigen. Hieraus ergab sich, daß die intraglobuläre Flüssigkeit immer ungefähr 40 bis 45 % des Volumens der Erythrocyten beträgt, eine Zahl, die sehr gut mit unserem Verhältnisse ühereinstimmt.

Man findet, daß der Chlorgehalt von 1 l Blutkörperchen ungefähr 40 % des Chlorgehaltes von 1 l Serum beträgt.

In 1 l Blutkörperchen ist auch nur 40 % intraglobuläre Flüssigkeit. Diese Flüssigkeit hat also dieselbe Chlorkonzentration wie das Serum.

Zusammenfassung.

Für das Chlor ist das Postulat „gleiches Verhältnis der anorganischen Bestandteile in Blutkörperchen und Serum“ wirklich erfüllt.

Man darf nicht die absoluten Zahlen vergleichen, sondern man muß in Betracht ziehen, daß für die osmotischen Verschiebungen bei den Blutkörperchen nur die Konzentration der intraglobulären Flüssigkeit in Betracht kommt.

Änderung der Permeabilität der roten Blutkörperchen durch Säurezusatz.

Von

J. Snapper.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 8. April 1913.)

Von Hamburger[1]) ist gezeigt worden, daß Zusatz von verschiedenen Säuren zu Blut in vitro eine Schwellung der Blutkörperchen und eine Chlorverschiebung verursacht. Das Chlor geht aus dem Serum in die Blutkörperchen. In den folgenden Experimenten wird ein Versuch gemacht werden, diesen Befund zu erklären.

a) Bestätigung der Chlor- und Wasserverschiebung unter Einfluß von Säuren.

Die Richtigkeit des Hamburgerschen Befundes wurde erst für Rinderblut und Hundeblut bestätigt.

Defibriniertes Rinderblut.

1. Zu 15 ccm Blut wurde 1 ccm H_2O zugesetzt.

$40^1/_2$% Blutkörperchen und $59^1/_2$% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 7,97 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.

Zum Zurücktitrieren wurden 2,20 ccm Rhodanammon gebraucht[2]).

Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$7{,}97 - 1{,}11 \times 2{,}2 = 7{,}97 - 2{,}44 = $ **5,53** ccm $AgNO_3$.

2. Zu 15 ccm Blut wurde 1 ccm $^n/_5$-H_2SO_4 zugesetzt.

44% Blutkörperchen und 56% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,36 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Man brauchte zum Zurücktitrieren 3,40 ccm Rhodanammon.

---

[1]) Hamburger, Arch. f. [Anat. u.] Physiol. **1892** und **1893**.

[2]) 1,11 ccm $AgNO_3$ = 1 ccm Rhodan-Ammon.

Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}36 - 1{,}11 \times 3{,}4 = 8{,}36 - 3{,}78 = \mathbf{4{,}58}$ ccm $AgNO_3$.

3. Zu 15 ccm Blut wird 1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 zugesetzt.

41% Blutkörperchen und 59% Serum.

Zu 5 ccm Serum wurden 8,60 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
Man brauchte zum Zurücktitrieren 3,05 ccm Rhodanammon.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}60 - 1{,}1 \times 3{,}05 = 8{,}60 - 3{,}48 = \mathbf{5{,}12}$ ccm $AgNO_3$.

4. Zu 15 ccm Blut wird 1 ccm $^n/_{20}$-H_2SO_4 zugesetzt.

41% Blutkörperchen und 59% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,00 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
Man brauchte zum Zurücktitrieren 2,45 ccm Rhodanammon.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}00 - 1{,}1 \times 2{,}45 = 8{,}00 - 2{,}72 = \mathbf{5{,}28}$ ccm $AgNO_3$.

5. 15 ccm Blut ohne mehr enthalten:

45% Blutkörperchen und 55% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,63 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
Man brauchte zum Zurücktitrieren 2,34 ccm Rhodanammon.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}36 - 1{,}1 \times 2{,}34 = 8{,}63 - 2{,}60 = \mathbf{6{,}03}$ ccm $AgNO_3$.

Resultat: Starke Schwellung der Blutkörperchen unter Einfluß von H_2SO_4-Zusatz. Deutliche Chlorverschiebung aus dem Serum in die Blutkörperchen.

Defibriniertes Hundeblut.

Von 15 ccm Blut wird jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt von:

1. 1 ccm H_2O.

$50\frac{1}{2}$% Blutkörperchen und $49\frac{1}{2}$% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,00 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
1,77 ccm Rhodanammon wurden zum Zurücktitrieren gebraucht.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}00 - 1{,}77 \times 1{,}11 = 8{,}00 - 1{,}96 = \mathbf{6{,}04}$ ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm $^n/_5$-H_2SO_4.

59% Blutkörperchen und 41% Serum.

Zu 4 ccm Serum werden 6,70 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
2,65 ccm Rhodanammon wurden zum Zurücktitrieren gebraucht.
Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit:

$6{,}70 - 1{,}11 \times 2{,}65 = 6{,}70 - 2{,}94 = 3{,}76$ ccm $AgNO_3$.

Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$^5/_4 \times 3{,}76 = \mathbf{4{,}70}$ ccm $AgNO_3$.

3. 1 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.

55% Blutkörperchen und 45% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,00 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
2,33 ccm Rhodanammon wurden zum Zurücktitrieren gebraucht.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}00 - 1{,}11 \times 2{,}33 = 8{,}00 - 2{,}58 = 5{,}42$ ccm $AgNO_3$.

4. 1 ccm $^{n}/_{20}$-H_2SO_4.

54% Blutkörperchen und 46% Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 8,01 ccm $AgNO_3$ zugesetzt.
Zum Zurücktitrieren waren 2,23 ccm Rhodanammon nötig.
Der Chlorgehalt von 5 ccm Serum stimmt überein mit:

$8{,}01 - 1{,}11 \times 2{,}23 = 8{,}01 - 2{,}48 = 5{,}53$ ccm $AgNO_3$.

Resultat: Starke Schwellung der Blutkörperchen unter Einfluß von H_2SO_4-Zusatz. Deutliche Chlorverschiebung aus dem Serum in die Blutkörperchen.

Defibriniertes Rinderblut.

Von 15 ccm Blut wird 1 ccm ersetzt von:

1. 1 ccm $^{n}/_{5}$-H_2SO_4.

$54\frac{1}{2}$% Blutkörperchen und $45\frac{1}{2}$% Serum.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit:

2,89 ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.

$51\frac{1}{2}$% Blutkörperchen und $48\frac{1}{2}$% Serum.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit:

3,49 ccm $AgNO_3$.

3. 1 ccm $^{n}/_{20}$-H_2SO_4.

$49\frac{1}{2}$% Blutkörperchen und $50\frac{1}{2}$% Serum.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit:

3,57 ccm $AgNO_3$.

4. 1 ccm H_2O.

49% Blutkörperchen und 51% Serum.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit:

3,75 ccm $AgNO_3$.

5. Der Chlorgehalt von 4 ccm Normal-Serum stimmt überein mit:

4,21 ccm $AgNO_3$.

48% Blutkörperchen und 52% Serum.

Resultat: Starke Schwellung der Blutkörperchen unter Einfluß von H_2SO_4-Zusatz. Deutliche Chlorverschiebung aus dem Serum in die Blutkörperchen.

Tabelle I.

Unter Einfluß von Säurezusatz zu Blut findet eine beträchtliche Wasser- und Chlorverschiebung aus dem Serum nach den Blutkörperchen statt.

	Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt durch						Wenn keine Chlorverschiebung eintritt, würde durch die Verdünnung mit chlorfreier Lösung der Chlorgehalt von 5 ccm Serum heruntergehen auf	Volumen d. Blutkörperchen des Blutes verdünnt mit 1 ccm H_2O
	1 ccm $^n/_5$-H_2SO_4		1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4		1 ccm $^n/_{20}$-H_2SO_4			
	Chlorgehalt von 5 ccm Serum	Volumen Blutkörperchen	Chlorgehalt von 5 ccm Serum	Volumen Blutkörperchen	Chlorgehalt von 5 ccm Serum	Volumen Blutkörperchen		
Kuh	4,58 ccm $AgNO_3$	44%	5,12 ccm $AgNO_3$	41%	5,28 ccm $AgNO_3$	41%	5,38 ccm $AgNO_3$	40½%
Hund	4,70 ccm $AgNO_3$	59%	5,42 ccm $AgNO_3$	55%	5,53 ccm $AgNO_3$	54%	5,74 ccm $AgNO_3$	50½%
Kuh	2,89 ccm $AgNO_3$, 4 ccm Serum	54½%	3,49 ccm $AgNO_3$, 4 ccm Serum	51½%	3,57 ccm $AgNO_3$	49½%	3,67 ccm $AgNO_3$, 4 ccm Serum	49%

Die Schwellung der Blutkörperchen und die Chlorverschiebung nach Säurezusatz, die von Hamburger beschrieben sind, können also bestätigt werden.

b) Einfluß von Säurezusatz auf den Alkaligehalt des Blutes in vitro.

Die Erklärung der Wasser- und Chlorverschiebung unter Einfluß von Säuren muß nach Hamburger[1]) gesucht werden in der Änderung des Alkaligehaltes des Blutes, die Säurezusatz hervorruft. Diese Änderung beruht auf den folgenden Verhältnissen.

Die alkalischen Substanzen des Blutes sind teils anorganische diffusible Verbindungen ($NaHCO_3$, Na_2HPO_4), teils sind sie in nichtdiffusibler Bindung an Eiweiß gebunden.

Zusatz von Säure wird aus diesen nichtdiffusiblen Alkaliverbindungen Natrium- und Kaliumsalze abspalten. Wenn man z. B. Schwefelsäure zusetzt, dann muß Na_2SO_4 entstehen.

Dieser Übergang von nichtdiffusiblem in diffusibles Alkali unter Einfluß von Säuren ist in folgender Weise näher geprüft worden.

[1]) Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre 1, 335.

Wenn wirklich der Säurezusatz aus dieser Abspaltung von diffusiblen Verbindungen gefolgert wird, muß man erwarten, daß auf Zusatz von schwachen Säuren der Total-Alkaligehalt nicht geändert, der diffusible Alkaligehalt aber erhöht wird.

Denkt man sich z. B., daß CO_2 zugesetzt sei, dann wird aus den Alkali-Eiweiß-Verbindungen Na_2CO_3 gebildet.

Das Natrium des Na_2CO_3 kann aber jetzt, in diffusibler Form, genau soviel Säure binden, als wenn es im Serum als Natrium-Eiweiß-Verbindung vorhanden war. Der Total-Alkaligehalt nimmt durch diesen Zusatz von schwachen Säuren also nicht ab.

Wohl aber geht ein Teil des nichtdiffusiblen Alkalis in die diffusible Form über.

Nach Zusatz von stärkeren Säuren liegt die Sachlage aber anders.

Durch H_2SO_4-Zusatz wird aus den Natrium-Eiweiß-Verbindungen Na_2SO_4 abgespalten, ein Salz, das keine Säure mehr binden kann. Das nichtdiffusible Alkali nimmt also in diesem Falle auch ab, dafür entsteht ein diffusibles, aber neutrales Salz. Die Folge ist also, daß das Total-Alkali abnimmt, das diffusible Alkali aber nicht zunimmt. Als Resultat wird auch hierdurch das Verhältnis des diffusiblen Alkalis zum Total-Alkali relativ gesteigert.

c) In vivo haben Säureinjektionen denselben Einfluß auf den Alkaligehalt des Serums wie Säurezusatz zu Blut in vitro.

Diese relative Vermehrung des diffusiblen Alkalis ist von Hamburger in vitro studiert worden. Wegen der großen Bedeutung, die diese Tatsache für die Erklärung der Chlorverschiebung unter Einfluß von Säurezusatz hatte, haben wir uns bemüht, dieselben Alkaliverschiebungen, die er im Reagensglas auffinden konnte, in vivo zu reproduzieren.

Zu diesem Zwecke haben wir intravenöse Säureeinspritzungen vorgenommen.

Vor und nach den Säureeinspritzungen wurde Blut entnommen und darin der Gehalt an Total-Alkali und diffusiblem Alkali bestimmt.

Zu dieser Bestimmung des Gehaltes an Total-Alkali wurde

so lange $^{n}/_{25}$-Weinsäure zugesetzt, bis mit Neutralrot-Papier[1]) die Reaktion als sauer erkannt wurde.

Für die Bestimmung des diffusiblen Alkaligehaltes wurde das Serum erst mit der zweifachen Menge 96 $^{0}/_{0}$igen Alkohols gefällt[2]).

Das Gemisch wurde zentrifugiert, der alkoholische Extrakt abgegossen und der Niederschlag wiederholt mit Alkohol ausgewaschen. Die Gesamtmenge des Alkohols wurde dann zum ursprünglichen Serumvolumen eingedampft. Der Alkaligehalt wurde dann mit $^{n}/_{25}$-Weinsäure und Neutralrot-Papier titriert.

Bei 4 $^{0}/_{0}$ Wassergehalt des Alkohols sind die relativ kleinen Mengen des diffusiblen Alkalis des Serums ($NaHCO_3$, Na_2HPO_4) leicht löslich. Das Eiweiß und die Alkali-Eiweiß-Verbindungen werden aber von dem Alkohol gefällt. So bekommt man eine leichte Trennung der Eiweißverbindungen von dem diffusiblen Alkali. Die auf diese Weise erhaltene Übereinstimmung der Werte mit den Werten der Dialysemethode ist früher öfters von Hamburger nachgeprüft worden[2]).

Wir haben mit diesen Methoden untersucht, ob die Alkaliverschiebungen nach Säurezusatz in vitro, die auf S. 65 beschrieben sind, auch in vivo durch intravenöse Säureeinspritzungen hervorgerufen werden.

Die meisten Versuche wurden mit Hunden gemacht. Die V. jugularis oder femoralis wurde präpariert und eine kleine Quantität Blut in einem Kolben aufgefangen, dessen Boden mit Glasperlen bedeckt war. Durch vorsichtiges Schütteln wurde defibriniert.

Inzwischen wurde die Säure in das zentrale Ende der Vene injiziert. Gleich hiernach wurde die Vene der anderen Seite präpariert, und 7 Minuten nach der Injektion wurde von neuem Blut entnommen und wie oben defibriniert.

Die Säureeinspritzung dauerte gewöhnlich 2 oder 3 Minuten. Die tiefe Atmung während und nach der Injektion war immer deutlich. Atemstillstand wurde nie gesehen.

Die Operation geschah in tiefem Morphiumschlaf (15 bis 20 mg pro Kilogramm Körpergewicht).

---

[1]) Siehe kurze Notiz in diesem Heft.

[2]) Hamburger, Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1898.

1. Hund ♂, 10 kg.

50 ccm Blut aus der V. jugularis defibriniert.

Injektion von 100 ccm 1,9 % Acid. tartaricum.

7 Minuten nach der Injektion wurde aus der anderen Jugularis wieder Blut genommen und defibriniert.

Vor der Säureinjektion neutralisierten 100 ccm Blutserum 60 ccm einer $^n/_{25}$-Weinsäurelösung.

Das alkoholische Filtrat von 100 ccm Serum neutralisierte 32 ccm $^n/_{25}$-Weinsäure.

Nach der Säureinjektion findet man, daß der Total-Alkaligehalt von 100 ccm Serum übereinstimmt mit 32 ccm $^n/_{25}$-Weinsäure, der diffusible Alkaligehalt von 100 ccm Serum mit 20 ccm $^n/_{25}$-Weinsäure.

Verhältnis $\frac{\text{Diffusibles Alkali}}{\text{Total-Alkali}}$ ist vor der Injektion $\frac{32}{60} = 53\,\%$, nach der Injektion $\frac{20}{32} = 63\,\%$.

2. Hund, 16 kg.

50 ccm Blut aus der V. jugularis.

Injektion von 100 ccm 1,9 % Acid. tartaricum.

7 Minuten nach der Injektion wieder Blut defibriniert.

Vor der Injektion neutralisiert der Total-Alkaligehalt von 100 ccm Serum 60 ccm $^n/_{25}$-Weinsäure, der diffusible Alkaligehalt 32 ccm.

Nach der Injektion waren diese Zahlen $42\,^1/_2$ ccm und 26 ccm.

Vor der Injektion war das Verhältnis $\frac{\text{Diffusibles Alkali}}{\text{Total-Alkali}} = \frac{32}{60} = 53\,\%$, nach der Injektion $\frac{26}{42{,}5} = 61\,\%$.

3. Hund, 12 kg.

40 ccm Blut aus der V. femoralis.

Injektion von 50 ccm einer isotonischen Na_2SO_4-Lösung, worin $^1/_2$ ccm konz. H_2SO_4 gelöst war.

Vor der Injektion enthielten 100 ccm Serum 57 ccm $^n/_{25}$-Alkali. Von dieser Alkalimenge waren 20 ccm in diffusibler Bindung.

Nach der Injektion waren diese Zahlen 43 ccm und 20 ccm.

Verhältnis $\frac{\text{Diffusibles Alkali}}{\text{Total-Alkali}}$ ist vor der Injektion $\frac{20}{57} = 35\,^1/_2\,\%$, nach der Injektion $\frac{20}{43} = 47\,\%$.

4. Ziege, 30 kg.

60 ccm Blut aus der Carotis.

Injektion von 150 ccm isotonischer Na_2SO_4-Lösung, worin $1\,^1/_2$ ccm konz. H_2SO_4 gelöst war.

Vor der Injektion enthielten 100 ccm Serum 52 ccm $^n/_{25}$-Alkali. Von dieser Alkalimenge waren $17\,^1/_2$ ccm in diffusibler Bindung.

Nach der Injektion waren diese Zahlen 43 ccm und $17^{1}/_{2}$ ccm. Verhältnis $\frac{\text{Diffusibles Alkali}}{\text{Total-Alkali}}$ ist vor der Injektion $\frac{17,5}{52} = 34\,\%$, nach der Injektion $\frac{17,5}{43} = 41\,\%$.

Tabelle II.

Änderungen des Alkaligehaltes des Serums nach intravenösen Säureinjektionen.

	Eingespritzt wurde	Total. Alkaligehalt von 100ccmSerum	Diffus. Alkaligehalt von 100ccmSerum	Total. Alkaligehalt von 100ccmSerum	Diffus. Alkaligehalt von 100ccmSerum	Diffus. Alkali / Total-Alkali vor der Injektion	Diffus. Alkali / Total-Alkali nach der Injektion
		vor d. Injektion		nach d. Injektion			
		ccm	ccm	ccm	ccm	%	%
Hund 10 kg	100 ccm 1,9% Acid. tartaric.	60	32	32	20	53	63
Hund 16 kg	100 ccm 1,9% Acid. tartaric.	60	32	$42^{1}/_{2}$	26	53	61
Hund 12 kg	50 ccm isoton. Na_2SO_4-Lösung + $^{1}/_{2}$ ccm H_2SO_4	57	20	43	20	$35^{1}/_{2}$	47
Ziege 30 kg	150 ccm isoton. Na_2SO_4-Lösung + $1^{1}/_{2}$ ccm H_2SO_4	52	$17^{1}/_{2}$	43	$17^{1}/_{2}$	34	41

In jedem Falle nimmt also der Alkaligehalt deutlich ab: besonders aber der nichtdiffusible Anteil. Offenbar neutralisiert das Tier bei Säureinjektion die Säure durch Abspaltung von diffusiblen Alkaliverbindungen aus den Alkali-Eiweißverbindungen.

In einigen Fällen wird auch das diffusible Alkali benutzt zur Bindung der exogenen Säuren. In allen Fällen zeigt sich eine relative Vermehrung des diffusiblen Alkalis dem nichtdiffusiblen gegenüber.

So konnte also die Vermehrung des diffusiblen Alkalis nach Säurezusatz, die von Hamburger in vitro aufgefunden war, auch in vivo gezeigt werden.

Die Erklärung, die Hamburger für die Chlorverschiebung nach Säurezusatz gegeben hat, fußt auf der Alkaliverschiebung, die unter demselben Einfluß entsteht.

d) Die Chlor- und Wasserverschiebung unter Einfluß von Säurezusatz erklärt durch den Übergang von nichtdiffusiblen in diffusible Verbindungen[1]).

Wie Zuntz[2]) gefunden hat, enthalten die Blutkörperchen mehr nichtdiffusibles Alkali als das Serum. Infolgedessen können bei Säurezusatz in den Blutkörperchen mehr diffusible Verbindungen abgespalten werden. Hierdurch wird der osmotische Druck der intraglobulären Flüssigkeit der Blutkörperchen mehr gesteigert als der osmotische Druck des Serums. Um diesen Unterschied im Druck auszugleichen, geht Wasser aus dem Serum in die Blutkörperchen. Infolgedessen schwellen die Erythrocyten.

Bei H_2SO_4-Zusatz wird also der Partialdruck der SO_4-Ionen innerhalb der Blutkörperchen höher als in dem Serum. Die Folge davon wird sein, daß SO_4-Ionen aus den Blutkörperchen in das Serum hinüberwandern müssen.

Wie bekannt, ist die Permeabilität der Blutkörperchen für anorganische Substanzen eine Permeabilität für Ionen; Salzmoleküle können in die Blutkörperchen nicht eindringen[3]). Nur für gesonderte Anionen, und vielleicht auch für Kationen[4]), sind die Blutkörperchen durchlässig. Aus dieser Regel folgt, daß, wenn ein Ion das Blutkörperchen verläßt, ein anderes Ion aus dem Serum in das Blutkörperchen hinübertreten muß, damit das elektrische Gleichgewicht nicht gestört wird. Wenn also bei H_2SO_4-Zusatz zu Blut SO_4-Ionen aus den Blutkörperchen in das Serum hinübergehen sollen, so müssen andere Ionen in der umgekehrten Richtung wandern. Für diese letzte Wanderung kommen in erster Linie die Chlor-Ionen in Betracht.

Dies wird um so leichter gehen, weil die Blutkörperchen Wasser aufgenommen haben und also die Konzentration der Salze — ausgenommen der SO_4-Ionen — in der intraglobulären Flüssigkeit abgenommen hat. Der partiale Druck der Chlorionen z. B. ist im Serum also höher als in den Blutkörperchen,

---

[1]) S. Hamburger, l. c.

[2]) Zuntz, Inaug.-Diss. Bonn 1868.

[3]) Koeppe, Arch. f. d. ges. Physiol. **67**, 189, 1897; Hamburger, Osmot. Druck und Ionenlehre **1**, 234ff.

[4]) Hamburger und Bubanovic, Arch. internat. de Physiol. **1911**, 1.

und deshalb werden, wenn die SO_4-Ionen von innen nach außen gehen, Chlor-Ionen von dem Serum nach innen gehen. Das Serum wird also chlorärmer.

Kurz gefaßt beruht deshalb diese Erscheinung ausschließlich auf der höheren Konzentration von SO_4-Ionen, die in den Blutkörperchen entsteht nach H_2SO_4-Zusatz zu Blut.

e) Die genannte Erklärung steht in Widerspruch zu den Chlorverschiebungen nach Na_2SO_4-Zusatz.

Um diese Erklärung zu prüfen, wäre eigentlich nötig, experimentell eine erhöhte SO_4-Ionenkonzentration in den Blutkörperchen herzustellen.

Diese Aufgabe ist nicht zu erfüllen. Wohl kann man experimentell die SO_4-Ionenkonzentration des Serums erhöhen. Man verursacht dann denselben Unterschied in der SO_4-Ionenkonzentration zwischen Blutkörperchen und Serum, nur in umgekehrter Richtung.

Weil die Permeabilität der Blutkörperchen in beiden Richtungen dieselbe ist, sollte man in diesem Falle die umgekehrten Wasser- und Chlorverschiebungen finden als bei H_2SO_4-Zusatz. Es hat sich ergeben, daß für Rinder-, Pferde- und Hundeblut dies nicht der Fall ist.

Während nach der Theorie Wasser und Chlor aus den Blutkörperchen nach dem Serum gehen sollten, sieht man, daß das Wasser sich tatsächlich in dieser Richtung bewegt; das Chlor aber verschiebt sich nicht oder geht von dem Serum nach den Blutkörperchen, also in derselben Richtung wie bei H_2SO_4-Zusatz statt in umgekehrter.

Je 15 ccm Rinderblut wurden zentrifugiert. Hiervon wurde jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm 11,1% Na_2SO_4-Lösung. Eine derartige Lösung ist dreifach hypertonisch. Man fand:

   $56\frac{1}{2}$% Serum und $43\frac{1}{2}$% Blutkörperchen.

   Zu 4 ccm Serum wurden 7,45 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,49 ccm Rhodanammon.

   1 ccm Rhodanammon = 1,1 ccm $AgNO_3$.

   4 ccm Serum sind gleich:

   $$7{,}45 - 1{,}1 \times 3{,}49 = 7{,}45 - 3{,}84 = 3{,}61 \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 1 ccm 7,4% Na_2SO_4 (zweifach hypertonisch):

   $55\frac{1}{2}$% Serum und $44\frac{1}{2}$% Blutkörperchen.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,13 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,14 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind gleich:

$$7{,}13 - 1{,}1 \times 3{,}14 = 7{,}13 - 3{,}45 = 3{,}68 \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch):

53 % Serum und 47 % Blutkörperchen.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,09 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,10 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind gleich:

$$7{,}09 - 1{,}1 \times 3{,}10 = 7{,}09 - 3{,}41 = 3{,}68 \text{ ccm } AgNO_3.$$

4. Zu 4 ccm Normal-Serum werden 7,22 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,74 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind gleich:

$$7{,}22 - 1{,}1 \times 2{,}74 = 7{,}22 - 3{,}01 = 4{,}21 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Das normale Blut enthielt:

52 % Serum und 48 % Blutkörperchen.

Resultat: Es fragt sich, inwieweit in diesem Versuche durch den Zusatz von Na_2SO_4 eine Chlorverschiebung verursacht ist.

Dazu muß man wissen, wie groß der Chlorgehalt des Serums wird durch den Ersatz einer gewissen Quantität Serum durch chlorfreie Lösung, z. B. Na_2SO_4, wenn keine Chlorverschiebung auftritt.

Im normalen Blute sind 52 % Serum, in 15 ccm Blut also

$$\frac{52}{100} \times 15 = 7{,}80 \text{ ccm Serum.}$$

1 ccm Serum wurde abpipettiert und ersetzt von chlorfreier Lösung. Die Chlorkonzentration von 4 ccm Serum würde hierdurch heruntergehen auf:

$$\frac{7{,}8 - 1{,}00}{7{,}8} \times 4{,}21 = 3{,}67 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Dieser Wert stimmt überaus gut überein mit dem gefundenen Werte. Das ist ein Beweis dafür, daß Ersatz von $\pm$ 6 % des Serums durch Na_2SO_4-Lösung keine Chlorverschiebung veranlaßt.

Defibriniertes Pferdeblut.

Im normalen Blut befanden sich:

62 % Serum und 38 % Blutkörperchen.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,02 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,46 ccm Rhodanammon.

4 ccm **Serum** sind gleich:

$$7{,}02 - 1{,}1 \times 2{,}46 = 7{,}02 - 2{,}71 = \mathbf{4{,}31} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Von 15 ccm Blut wurde jedesmal 1 ccm abgenommen und ersetzt durch:

1. 1 ccm 11,1% Na_2SO_4 (3 mal hypertonisch):

65% Serum und 35% Blutkörperchen.

Zu 4 ccm Serum wurden 5 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,09 ccm Rhodanammon.

4 ccm **Serum** sind gleich:

$$5{,}00 \times 1{,}1 \times 1{,}09 = 5{,}00 - 1{,}20 = \mathbf{3{,}80} \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 1 ccm 7,4% Na_2SO_4 (2 mal hypertonisch):

64% Serum und 36% Blutkörperchen.

Zu 4 ccm Serum wurden 5,01 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,14 ccm Rhodanammon.

4 ccm **Serum** sind gleich:

$$5{,}01 - 1{,}1 \times 1{,}14 = 5{,}01 - 1{,}25 = \mathbf{3{,}76} \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 1 ccm 3,7%ige Na_2SO_4-Lösung (isotonisch):

37½% Blutkörperchen und 62½% Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 5 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,07 ccm Rhodanammon.

4 ccm **Serum** sind gleich:

$$5{,}00 \times 1{,}1 \times 1{,}07 = 5{,}00 - 1{,}18 = \mathbf{3{,}82} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Resultat: Auch hier kann man von Chlorverschiebung eigentlich nicht reden:

$$15 \text{ ccm Blut enthalten } \frac{62}{100} \times 15 = 9{,}30 \text{ ccm Serum.}$$

Durch den Ersatz von 1 ccm Serum durch chlorfreie Lösung würde ohne Chlorverschiebung die Chlorkonzentration von 4 ccm Serum heruntergehen auf:

$$\frac{9{,}3 - 1{,}00}{9{,}3} \times 4{,}31 = \mathbf{3{,}85} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Aus der Übereinstimmung des berechneten Wertes mit dem gefundenen ergibt sich, daß eine Chlorverschiebung nicht stattgefunden hat.

Defibriniertes Hundeblut.

Im normalen Blute befanden sich:

47% Serum und 53% Blutkörperchen.

Zu 5 ccm Serum wurden 7,18 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Beim Zurücktitrieren verbrauchte man 0,87 ccm Rhodanammon.

1 ccm Rhodanammon = 0,97 ccm $AgNO_3$.

5 ccm Serum stimmen überein mit:

$$7{,}13 - 0{,}97 \times 0{,}87 = 7{,}13 - 0{,}84 = 6{,}29 \text{ ccm } AgNO_3.$$

$3\,^1/_2$ ccm Serum sind gleich:

$$\frac{35}{50} \times 6{,}29 = \mathbf{4{,}40} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Von 10 ccm Blut werden jedesmal 0,6 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 0,6 ccm H_2O:

54 % Blutkörperchen und 46 % Serum.

Zu $3\,^1/_2$ ccm Serum werden 5,03 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Beim Zurücktitrieren brauchte man 1,10 ccm Rhodanammon.

$3\,^1/_2$ ccm Serum sind gleich:

$$5{,}03 - 0{,}97 \times 1{,}10 = 5{,}03 - 1{,}07 = \mathbf{3{,}96} \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 0,6 ccm 11,1 % Na_2SO_4 (3 mal hypertonisch):

49 % Blutkörperchen und 51 % Serum.

Zu $3\,^1/_2$ ccm Serum wurden 4,68 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Beim Zurücktitrieren brauchte man 1,20 ccm Rhodanammon.

$3\,^1/_2$ ccm Serum sind gleich:

$$4{,}86 - 0{,}97 \times 1{,}20 = 4{,}86 - 1{,}17 = \mathbf{3{,}70} \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 0,6 ccm 7,4 % Na_2SO_4 (2 mal hypertonisch):

$50\,^1/_2$ % Blutkörperchen und $49\,^1/_2$ % Serum.

Zu $3\,^1/_2$ ccm Serum wurden 4,70 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Beim Zurücktitrieren brauchte man 0,99 ccm Rhodanammon.

$3\,^1/_2$ ccm Serum sind gleich:

$$4{,}70 - 0{,}97 \times 0{,}99 = 4{,}70 - 0{,}96 = \mathbf{3{,}74} \text{ ccm } AgNO_3.$$

4. 0,6 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch).

53 % Blutkörperchen und 47 % Serum.

Zu $3\,^1/_2$ ccm Serum wurden 4,69 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Beim Zurücktitrieren brauchte man 1,15 ccm Rhodanammon.

$3\,^1/_2$ ccm Serum sind gleich:

$$4{,}96 - 0{,}97 \times 1{,}15 = 4{,}96 - 1{,}11 = \mathbf{3{,}85} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Resultat: 10 ccm Blut enthalten 4,7 ccm Serum. Wenn von 10 ccm Blut 0,6 ccm Serum ersetzt werden durch 0,6 ccm chlorfreier Lösung, wird ohne Chlorverschiebung der Chlorgehalt von $3\,^1/_2$ ccm Serum übereinstimmen mit:

$$\frac{4{,}7 - 0{,}6}{4{,}7} \times 4{,}4 = 3{,}84 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Aus dieser Zahl ergibt sich, daß die Chlorverschiebung hier nicht stark war und sich jedenfalls in derselben Richtung bewegt, wie nach H_2SO_4-Zusatz.

Defibriniertes Pferdeblut.

Von 15 ccm Blut wurde jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm 11,1 % Na_2SO_4.
   4 ccm Serum sind gleich: 3,82 ccm $AgNO_3$.
2. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4.
   4 ccm Serum sind gleich: 3,95 ccm $AgNO_3$.
3. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4.
   4 ccm Serum sind gleich: 3,96 ccm $AgNO_3$.
4. 4 ccm Normalserum stimmen überein mit 4,44 ccm $AgNO_3$.

Im normalen Blut befinden sich:

66 % Serum und 34 % Blutkörperchen.

Resultat: 15 ccm Blut enthalten

$$\frac{66}{100} \times 15 = 9,9 \text{ ccm Serum.}$$

Wenn von 15 ccm Blut 1 ccm Serum ersetzt wird durch chlorfreie Lösung, wird ohne Chlorverschiebung der Chlorgehalt von 4 ccm übereinstimmen mit:

$$\frac{9,9 - 1,0}{9,9} \times 4,44 = 3,99 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Die Chlorverschiebung, von Na_2SO_4-Lösung verursacht, ist also hier auch nicht stark.

Defibriniertes Hundeblut.

Von 15 ccm Blut wird jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4.
   4 ccm Serum sind gleich: 4,15 ccm $AgNO_3$.
2. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4.
   4 ccm Serum sind gleich: 4,18 ccm $AgNO_3$.
3. 4 ccm Normal-Serum stimmen überein mit 4,77 ccm $AgNO_3$.

Im normalen Blute befinden sich:

54 % Serum und 46 % Blutkörperchen.

Resultat: Wenn keine Chlorverschiebung stattfand, würde der Chlorgehalt von 4 ccm Serum nach dem Ersatz von 1 ccm Serum durch chlorfreie Lösung übereinstimmen mit:

$$\frac{5,4 \times 15 - 1,0}{5,4 \times 15} \times 4,77 = \frac{71}{81} \times 4,77 = 4,18 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Auch hier kommt durch den Ersatz von Serum durch iso- oder hypertonische Na_2SO_4-Lösung keine Chlorverschiebung zustande.

Im allgemeinen zeigen diese Versuche, daß beim Pferd, Rind und Hund der alleinige Unterschied in der SO_4-Ionenkonzentration von Blutkörperchen und Serum keine Chlorverschiebung hervorruft. Der gefundene Chlorgehalt des Serums stimmt überein mit dem Werte, der durch die Verdünnung des Serums mit chlorfreier Lösung bedingt wird.

Tabelle III.

Bei Pferd, Kuh und Hund verursacht der Erzatz eines Teiles des Blutserums durch iso- oder hypertonische Na_2SO_4-Lösung keine Chlorverschiebung: der Chlorgehalt des Serums stimmt überein mit dem Gehalt, der entstehen würde bei Verdünnung des Serums mit chlorfreier Lösung, wenn keine Chlorverschiebung stattfände.

	Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt durch 1 ccm 11,1 %iger Na_2SO_4-Lösung. 4 ccm Serum stimmen überein mit	Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt durch 1 ccm 7,4 %iger Na_2SO_4-Lösung. 4 ccm Serum stimmen überein mit	Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt durch 1 ccm 3,7 %iger Na_2SO_4-Lösung (isotonisch). 4 ccm Serum stimmen überein mit	Wenn keine Chlorverschiebg. stattfand, würde durch den Ersatz von 1 ccm Serum durch 1 ccm chlorfreier Lösung der Chlorgehalt von 4 ccm Serum übereinstimmen mit
Kuh . . .	3,61 ccm $AgNO_3$	3,68 ccm $AgNO_3$	3,68 ccm $AgNO_3$	3,67 ccm $AgNO_3$
Pferd . .	3,80 „ „	3,76 „ „	3,82 „ „	3,85 „ „
Hund . .	3,70 „ „	3,74 „ „	3,85 „ „	3,84 „ „
		3 ½ ccm Serum		
Pferd . .	3,82 ccm $AgNO_3$	3,95 ccm $AgNO_3$	3,96 ccm $AgNO_3$	3,99 ccm $AgNO_3$
Hund . .	—	4,15 „ „	4,18 „ „	4,18 „ „

Das Ergebnis dieser Versuche ist also mit der Hamburgerschen Erklärung der Chlorverschiebung nicht in Übereinstimmung zu bringen.

f) Auch die Chlorverschiebungen unter Einfluß von gleichzeitigem Zusatz von H_2SO_4 und Na_2SO_4 sind nicht mit der genannten Erklärung in Übereinstimmung.

Wir haben noch auf andere Weise versucht, tiefer in den Mechanismus der Chlorverschiebung unter Säurezusatz einzudringen.

Wenn wirklich die Chlorverschiebungen ausschließlich abhängig wären von dem Übermaß an SO_4-Ionen im Innern der

Blutkörperchen, so müßte, wenn man zugleich mit dem H_2SO_4 auch Na_2SO_4 zusetzte, die Differenz in der Konzentration zwischen den SO_4-Ionen in den Blutkörperchen und im Serum kleiner werden.

Die Chlorverschiebung müßte also weniger stark sein. Es hat sich aber ergeben, daß der gleichzeitige Zusatz von Na_2SO_4 und H_2SO_4 die Chlorverschiebung aus dem Serum nach den Blutkörperchen statt kleiner noch viel größer macht.

Als Beispiel folgen zwei Versuche.

Defibriniertes Pferdeblut.

Von 15 ccm Blut wurde je 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

$42^1/_2$% Blutkörperchen und $57^1/_2$% Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 5,02 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,11 ccm Rhodanammon[1]).

4 ccm Serum sind gleich also:

$$5{,}02 - 1{,}1 \times 1{,}11 = 5{,}02 - 1{,}22 = 3{,}80 \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 1 ccm 11,1% Na_2SO_4 (hypertonisch).

35% Blutkörperchen und 65% Serum.

Zu 4 ccm wurden 5 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,09 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind gleich also:

$$5{,}00 - 1{,}1 \times 1{,}09 = 5{,}00 - 1{,}20 = 3{,}80 \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 1 ccm einer Lösung von $^n/_{10}$-H_2SO_4, wozu zugleich 11,1% Na_2SO_4 zugesetzt war.

$36^1/_2$% Blutkörperchen und $63^1/_2$% Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 4,98 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,50 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind gleich also:

$$4{,}98 - 1{,}1 \times 1{,}50 = 4{,}98 - 1{,}65 = 3{,}33 \text{ ccm } AgNO_3.$$

Resultat: Durch gleichzeitigen Zusatz von Na_2SO_4 wird die Chlorverschiebung aus dem Serum nach den Blutkörperchen nicht verringert, sondern verstärkt.

Ein derartiger Versuch mit defibriniertem Rinderblut hatte ein gleiches Resultat.

Von 15 ccm Blut wurde je 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

$48^1/_2$% Serum und $51^1/_2$% Blutkörperchen.

---

[1]) 1 ccm Rhodanammon = 1,1 ccm $AgNO_3$.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,10 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,29 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind also gleich:

$$7{,}10 - 1{,}1 \times 3{,}29 = 7{,}10 - 3{,}62 - 3{,}48 \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 1 ccm $^{n}/_{20}$-H_2SO_4.

$49^1/_2\,\%$ Blutkörperchen und $50^1/_2\,\%$ Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,09 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,20 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind also gleich:

$$7{,}09 - 1{,}1 \times 1{,}32 = 7{,}09 - 3{,}52 = 3{,}57 \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 1 ccm 11,1 % Na_2SO_4 (3 mal hypertonisch).

$43^1/_2\,\%$ Blutkörperchen und $56^1/_2\,\%$ Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,45 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,49 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind also gleich:

$$7{,}45 - 1{,}1 \times 3{,}49 = 7{,}45 - 3{,}84 = 3{,}61 \text{ ccm } AgNO_3.$$

4. 1 ccm einer $^{n}/_{10}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 11,1 % Na_2SO_4 enthielt.

25 % Blutkörperchen und 55 % Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,50 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,90 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind also gleich:

$$7{,}50 - 1{,}1 \times 3{,}90 = 7{,}50 - 4{,}29 = 3{,}21 \text{ ccm } AgNO_3.$$

5. 1 ccm einer $^{n}/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 11,1 % Na_2SO_4 enthielt.

44 % Blutkörperchen und 56 % Serum.

Zu 4 ccm Serum wurden 7,05 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 3,35 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum sind also gleich:

$$7{,}05 - 1{,}1 \times 3{,}35 = 7{,}05 - 3{,}69 = 3{,}36 \text{ ccm } AgNO_3.$$

6. 1 ccm H_2O.

49 % Blutkörperchen und 51 % Serum.

Resultat: Auch hier gilt dasselbe wie bei dem vorigen Versuch: durch gleichzeitigen Zusatz von Na_2SO_4 wird die Chlorverschiebung aus dem Serum nach den Blutkörperchen nicht verringert, sondern stark vermehrt.

Defibriniertes Hundeblut.

Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt durch:

1. 1 ccm 7,4 %-Na_2SO_4.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit 4,15 ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm einer $^{n}/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 7,4 % Na_2SO_4 enthält.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit **3,96** ccm $AgNO_3$.

Resultat wie in den beiden vorigen Versuchen.

Defibriniertes Pferdeblut.

Von 15 ccm Blut wird 1 ccm Serum ersetzt von:

1. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit **4,28** ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm einer $^{n}/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 7,4 % Na_2SO_4 enthält.

Der Chlorgehalt von 4 ccm Serum stimmt überein mit **4,15** ccm $AgNO_3$.

Resultat wie oben.

Tabelle IV.

Durch gleichzeitigen Zusatz von H_2SO_4 und Na_2SO_4 wird die Chlorverschiebung von dem Serum nach den Blutkörperchen nicht kleiner.

Im Gegenteil: während, wie sich aus Tabelle III ergibt, alleiniger Zusatz von Na_2SO_4 keine Chlorverschiebung hervorruft, verstärkt Na_2SO_4 die Chlorverschiebung, die von H_2SO_4 verursacht wird, beträchtlich.

Das Na_2SO_4 verursacht also keine Chlorverschiebung im normalen Blute, wohl aber im Blut, das mit Säure versetzt ist.

	Von 15 ccm Blut wurde 1 ccm Serum ersetzt durch							
	1 ccm Na_2SO_4 11,1 %	1 ccm Na_2SO_4 7,4 %	1 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4	1 ccm $^{n}/_{20}$-H_2SO_4	1 ccm Na_2SO_4 11,1 % und $^{n}/_{10}$-H_2SO_4	1 ccm Na_2SO_4 11,1 % und $^{n}/_{20}$-H_2SO_4	1 ccm Na_2SO_4 7,4 % und $^{n}/_{20}$-H_2SO_4	
Pferd . .	3,80 ccm $AgNO_3$	—	3,80 ccm $AgNO_3$	—	3,33 ccm $AgNO_3$	—	—	entsprechend dem Chlorgehalt von 4 ccm Serum
Rind . .	3,61 ccm $AgNO_3$	—	3,48 ccm $AgNO_3$	3,57 ccm $AgNO_3$	3,21 ccm $AgNO_3$	3,36 ccm $AgNO_3$	—	
Hund . .	—	4,15 ccm $AgNO_3$	—	—	—	—	3,96 ccm $AgNO_3$	
Pferd . .	—	4,28 ccm $AgNO_3$	—	—	—	—	4,15 ccm $AgNO_3$	

g) Durch den Säurezusatz werden offenbar die Bedingungen für das Durchtreten der verschiedenen Ionen — d. h. die Permeabilität — modifiziert.

Man sieht also, daß die Chlorverschiebung unter Einfluß von H_2SO_4 verstärkt wird, wenn man H_2SO_4 und Na_2SO_4 zusetzt.

Dieses Resultat ist um so merkwürdiger, weil gewöhnlich der Na_2SO_4-Zusatz an sich keine Chlorverschiebung verursacht. Setzt man dieses Salz aber zugleich mit der Säure zu, dann ist es imstande, die Chlorverschiebung zu verstärken.

Dieses deutet schon hin auf die Möglichkeit, daß Na_2SO_4 in Gegenwart von Säuren eine andere Wirkung entfalten kann, als wenn es zu normalem Blut zugesetzt wird. Diese Auffassung wird durch die zwei folgenden Versuche bestätigt.

Defibriniertes Hundeblut.

Von 15 ccm Blut wurde jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm $^n/_{20}$-H_2SO_4.

Zu 4 ccm Serum wurden 6,05 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,11 ccm Rhodanammon.

1 ccm Rhodanammon = 0,86 ccm $AgNO_3$.

4 ccm Serum stimmen überein mit:

$$6{,}05 - 0{,}86 \times 2{,}77 = 6{,}05 - 1{,}82 = \mathbf{4{,}23} \text{ ccm } AgNO_3.$$

2. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4 (2mal hypertonisch).

Zu 4 ccm Serum wurden 6,08 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,24 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum stimmen überein mit:

$$6{,}08 - 0{,}86 \times 2{,}24 = 6{,}08 - 1{,}93 = \mathbf{4{,}15} \text{ ccm } AgNO_3.$$

3. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch).

Zu 4 ccm Serum wurden 6,18 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,32 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum stimmen überein mit:

$$6{,}18 - 0{,}86 \times 2{,}32 = 6{,}18 - 2{,}00 = \mathbf{4{,}18} \text{ ccm } AgNO_3.$$

4. 1 ccm einer $^n/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zu gleicher Zeit 7,4 % Na_2SO_4 enthielt.

Zu 4 ccm Serum wurden 6,10 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,48 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum stimmen überein mit:

$$6{,}10 - 0{,}86 \times 2{,}48 = 6{,}10 - 2{,}14 = \mathbf{3{,}96} \text{ ccm } AgNO_3.$$

5. 1 ccm $^n/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 3,7 % Na_2SO_4 enthielt.

Zu 4 ccm Serum wurden 6,22 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,48 ccm Rhodanammon.

4 ccm Serum stimmen überein mit:

$$6{,}22 - 0{,}86 \times 2{,}48 = 6{,}22 - 2{,}14 = \mathbf{4{,}08} \text{ ccm } AgNO_3.$$

Resultat: Wie auch aus den vorhergehenden Versuchen schon folgte, bekommt man ebensowenig eine Chlorverschiebung, ob man das Serum ersetzt durch 3,7 % Na_2SO_4 oder durch 7,4 % Na_2SO_4.

Wenn aber zugleich mit der Na_2SO_4-Lösung Säure zugesetzt wird, dann macht es wohl einen Unterschied, ob man mit 3,7 % oder 7,4 % Na_2SO_4-Lösung arbeitet. Die 7,4 %ige Na_2SO_4-Lösung verursacht dann eine viel stärkere Chlorverschiebung als die 3,7 %ige.

Das ist ein Argument für die Annahme, daß der Säurezusatz die Permeabilität modifiziert, so daß der Effekt durch einen Na_2SO_4-Zusatz geändert wird.

Defibriniertes Pferdeblut.

Von 10 ccm Blut wurden jedesmal 0,6 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 0,6 ccm 7,4 %ige Na_2SO_4-Lösung.
   4 ccm Serum stimmen überein mit: 4,28 ccm $AgNO_3$.
2. 0,6 ccm 3,7 %ige Na_2SO_4-Lösung.
   4 ccm Serum stimmen überein mit: 4,30 ccm $AgNO_3$.
3. 0,6 ccm einer $^n/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleich 7,4 % Na_2SO_4 enthielt.
   4 ccm Serum stimmen überein mit: 4,15 ccm $AgNO_3$.
4. 0,6 ccm einer $^n/_{20}$-H_2SO_4-Lösung, die zugleieh 3,7 % Na_2SO_4 enthielt.
   4 ccm Serum stimmen überein mit: 4,27 ccm $AgNO_3$.

Aus diesem Versuch ergibt sich dasselbe, wie aus dem vorhergehenden.

Tabelle V.

Nach Ersatz eines Teiles (± 6 %) des Serums durch 7,4 % Na_2SO_4 ist der Chlorgehalt des Serums derselbe als nach Ersatz durch 3,7 % Na_2SO_4. Ist aber zugleich Säure da, dann verursacht die 7,4 %ige Lösung eine viel stärkere Chlorverschiebung als die 3,7 %ige.

	Von 10 ccm Blut wird 0,6 ccm Serum ersetzt durch				
	0,6 ccm Na_2SO_4 7,4 %	0,6 ccm Na_2SO_4 3,7 %	0,6 ccm Na_2SO_4 7,4 % und $^n/_{20}$-H_2SO_4	0,6 ccm Na_2SO_4 3,7 % und $^n/_{20}$-H_2SO_4	
Hund . .	4,15 ccm $AgNO_3$	4,18 ccm $AgNO_3$	3,96 ccm $AgNO_3$	4,08 ccm $AgNO_3$	Chlorgehalt von 4 ccm Serum
Pferd . .	4,28 ccm $AgNO_3$	4,30 ccm $AgNO_3$	4,15 ccm $AgNO_3$	4,27 ccm $AgNO_3$	

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß es für die Chlorverschiebungen keinen großen Unterschied macht, ob man von 15 ccm Blut 1 ccm Serum ersetzt durch 7,4 %ige Na_2SO_4-

Lösung oder durch eine 3,7 %ige Na_2SO_4-Lösung. Ersatz von 6 % des Serums durch eine dieser Lösungen wird nicht von einer Chlorverschiebung begeitet. Sobald man aber eine $^n/_{20}$-H_2SO_4-Lösung zugleich mit den Salzen zusetzt, ändert sich die Sachlage.

Jetzt geht unter dem Einfluß von 7,4 % Na_2SO_4 vielmehr Chlor aus dem Serum nach den Blutkörperchen als unter dem Einfluß von 3,7 % Na_2SO_4.

Dieses Ergebnis verstärkte die oben ausgesprochene Vermutung, daß wenn Säure zu dem Blute zugesetzt wird, die osmotischen Prozesse auf andere Weise verlaufen, als es normaliter der Fall ist. Die Semipermeabilität der Blutkörperchen ist unter dem Einfluß von Säuren geändert.

Man muß annehmen, daß, wenn Säure zugesetzt ist, die verschiedenen Ionen leichter oder weniger leicht durch die Wand der Blutkörperchen durchtreten können, als dies im unversehrten Blute der Fall ist.

h) Durch Chloroformzusatz zu Blut wird die Permeabilität der roten Blutkörperchen nicht geändert.

Bis jetzt hat man sich gewöhnlich gedacht, daß die Permeabilität der roten Blutkörperchen von äußeren Einflüssen nicht geändert wird. Man dachte hierbei immer an die gut begründeten Meinung, daß die Oberfläche die Erythrocyten aus lipoiden Substanzen zusammengesetzt wäre. Durch die Konstitution dieser oberflächlichen Schicht sollte die Semipermeabilität der Blutkörperchen bestimmt sein.

Wenn das der Fall ist, könnte man erwarten, daß, wenn es überhaupt möglich ist, die Permeabilität zu ändern, speziell Zusatz von lipolytischen Substanzen diese Änderung hervorrufen würde.

Die Lipolytica werden wohl am meisten ein derartiges Gebilde, wie man es für die äußere Wand der Blutkörperchen annahm, ändern.

Zur Entscheidung der Frage, ob die Permeabilität der roten Blutkörperchen zu modifizieren ist oder nicht, sind von Hamburger[1]) einige Versuche gemacht.

---

[1]) Hamburger, Zur Biologie der Phagocyten 1912, S. 199. Wiesbaden, J. Bergmann.

Zu diesem Zwecke untersuchte er die Hämolyse unter dem Einfluß von hypotonischen Salzlösungen mit und ohne gleichzeitigen Zusatz von Chloroform.

Wie allgemein bekannt, beruht die Hämolyse unter dem Einfluß von verdünnten Salzlösungen gerade auf der Semipermeabilität der Blutkörperchen. Wenn man die Blutkörperchen in eine hypotonische NaCl-Lösung bringt, muß folgendes geschehen:

Weil die Blutkörperchen für Salze impermeabel sind, kann der osmotische Druck des Blutkörpercheninhaltes nicht verringert werden durch Übertreten von Salzen aus den Blutkörperchen nach dem Serum. Dennoch muß der osmotische Druck der Blutkörperchen heruntergehen, weil sie sich in einer hypotonischen Lösung befinden.

Weil Salzverschiebungen ausgeschlossen sind, kann dies allein geschehen durch Wasserverschiebung.

Wasser geht also in die Blutkörperchen, um den Inhalt zu verdünnen. Hierdurch schwellen die Blutkörperchen. Je weniger konzentriert die Salzlösung, worin die Erythrocyten suspendiert sind, um so mehr Wasser wird in die Blutkörperchen gehen, und um so mehr werden die Blutkörperchen schwellen; am Ende platzen sie.

M. a. W. die Hämolyse unter Einfluß von verdünnten Salzlösungen wird bedingt von der Semipermeabilität der Erythrocyten: Salze können nicht in die Blutkörperchen eindringen, nur Ionen.

Der osmotische Druck des Blutkörpercheninhalts kann aber durch Ionenwechsel nur wenig geändert werden.

Weil die Struktur der Blutkörperchen das anatomische Substrat dieser spezifischen Semipermeabilität darstellt, konnte man also erwarten, daß lipolytische Substanzen, die einen Einfluß auf die Verbindungen haben, die die Blutkörperchenwand aufbauen, die spezifische Semipermeabilität ändern würden.

In diesem Falle würde man dann unter dem Einfluß von Chloroformzusatz eine geänderte Hämolyse durch hypotonische Salzlösungen erwarten können.

Hamburger hat aber gefunden, daß weder Chloroform-, noch Äther-, noch Alkohol-Zusatz die Hämolyse unter Einfluß von verdünnten Salzlösungen beeinflußt. Die Permeabilität von

normalen Blutkörperchen und von Blutkörperchen, die mit Chloroform versetzt sind, ist dieselbe.

Wir haben uns bemüht, diese Tatsache durch direkte Analyse näher zu begründen. In der Tat konnten wir Hamburgers Befund bestätigen und zeigen, daß die Chlorverschiebungen, die unter Einfluß von Na_2SO_4-Zusatz im Blute auftreten, denselben Verlauf im normalen Blute als im Blute, das reichlich mit Chloroform versetzt ist, nehmen.

Von defibriniertem Pferdeblut wurden jedesmal 15 ccm genommen. Hiervon wurde 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm H_2O.

36 % Blutkörperchen und 64 % Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 7,23 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,16 ccm Rhodanammon. 1 ccm Rhodan = 0,97 ccm $AgNO_3$.

5 ccm Serum stimmen überein mit:

$7,23 - 0,97 \times 2,16 = 7,23 - 2,10 =$ **5,13** ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4 (2mal hypertonisch).

31½ % Blutkörperchen und 68½ % Serum.

Zu 5 ccm Serum werden 7,03 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 2,77 ccm Rhodanammon.

5 ccm Serum stimmen überein mit:

$7,03 - 0,97 \times 2,17 = 7,03 - 2,10 =$ **4,93** ccm $AgNO_3$.

3. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch).

33½ % Blutkörperchen und 66½ % Serum.

Zu 5 ccm Serum wurden 6,66 ccm $AgNO_3$ zugesetzt. Zum Zurücktitrieren brauchte man 1,77 ccm Rhodanammon.

5 ccm Serum stimmen überein mit:

$6,66 - 0,97 \times 1,77 = 6,66 - 1,72 =$ **4,94** ccm $AgNO_3$.

Zu 65 ccm Blut werden 1,2 ‰ i. e. 0,075 ccm Chloroform zugesetzt; es folgt deutliche Hämolyse. Dann werden dieselben Bestimmungen wiederholt.

Von 15 ccm dieses Chloroformblutes wird jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm H_2O.

35 % Blutkörperchen und 65 % Serum.

5 ccm Serum stimmen überein mit: **5,12** ccm $AgNO_3$.

2. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4.

31½ % Blutkörperchen und 68½ % Serum.

5 ccm Serum stimmen überein mit: **4,96** ccm $AgNO_3$.

3. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4.
34 % Blutkörperchen und 66 % Serum.
5 ccm Serum stimmen überein mit: **4,96** ccm $AgNO_3$.

Die Übereinstimmung zwischen den beiden Bestimmungsreihen ist eine recht gute. Obgleich so viel Chloroform zugesetzt ist, daß deutliche Hämolyse auftritt, ist die Permeabilität unverändert.

Ein gleiches Resultat erhielten wir unter denselben Umständen mit Hundeblut:

Von 15 ccm defibriniertem Hundeblut wird jedesmal 1 ccm Serum abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4 (2 mal hypertonisch).
4 ccm Serum stimmen überein mit: **4,29** ccm $AgNO_3$.
2. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch).
4 ccm Serum stimmen überein mit: **4,34** ccm $AgNO_3$.

Zu 75 ccm Blut wird 1 ‰ i. e. 0,75 ccm Chloroform zugesetzt. Deutliche Hämolyse.

Von 15 ccm dieses Chloroformblutes wurde jedesmal 1 ccm abpipettiert und ersetzt durch:

1. 1 ccm 7,4 % Na_2SO_4 (2mal hypertonisch).
4 ccm Serum stimmen überein mit: **4,27** ccm $AgNO_3$.
2. 1 ccm 3,7 % Na_2SO_4 (isotonisch).
4 ccm Serum stimmen überein mit: **4,37** ccm $AgNO_3$.

Auch hier hat Chloroform keinen Einfluß auf die Chlorverschiebungen, die durch den Ersatz von Serum durch Na_2SO_4 verursacht werden.

Tabelle VI.

Es besteht kein Unterschied in der Permeabilität der normalen und der von Chloroform geschädigten Blutkörperchen.

	Von 15 ccm Blut wird je 1 ccm Serum ersetzt durch					
	1 ccm H_2O		1 ccm Na_2SO_4 7,4 %		1 ccm Na_2SO_4 3,7 %	
	Normales Blut	Chloroform-Blut	Normales Blut	Chloroform-Blut	Normales Blut	Chloroform-Blut
Pferd	5,13 ccm $AgNO_3$	1,2 ‰ $CHCl_3$ 5,12 ccm $AgNO_3$	4,93 ccm $AgNO_3$	1,2 ‰ $CHCl_3$ 4,96 ccm $AgNO_3$	4,94 ccm $AgNO_3$	1,2 ‰ $CHCl_3$ 4,96 ccm $AgNO_3$
	per 5 ccm Serum					
Hund	—	—	4,29 ccm $AgNO_3$	4,27 ccm $AgNO_3$	4,34 ccm $AgNO_3$	4,37 ccm $AgNO_3$
			per 4 ccm Serum			

i) Schon a priori ist es einleuchtend, daß Lipolytica nicht, wohl aber Säuren einen Einfluß auf die Permeabilität der Blutkörperchen haben können.

Die Tatsache, daß Lipolytica keinen Einfluß auf die Permeabilität haben, darf man aber nicht betrachten als den Beweis, daß eine Änderung der Permeabilität überhaupt unmöglich sei. Die hier besprochene Permeabilität, d. h. die Permeabilität für anorganische Ionen, kann nicht abhängig sein von den lipoiden Substanzen, aus denen die Blutkörperchen aufgebaut sind.

Viel wahrscheinlicher wird sie bedingt von den nichtlipoiden Substanzen, die sich an dem Aufbau der Erythrocyten beteiligen.

Daß wirklich nichtlipoide Substanzen in dem Blutkörperchengerüst vorhanden sind, ist schon wiederholte Male bewiesen[1]). Es hat sich ergeben, daß Hämolytica, die ausschließlich lipoide Substanzen destruieren, wie z. B. Saponine, zwar Hämolyse verursachen können; aber nach Saponinzusatz bleiben immer die Gerüste der Blutkörperchen, die sog. „Schatten", übrig. Setzt man aber Hämolytica zu, die außer Lipoiden auch eiweißartige Substanzen lösen können, wie z. B. die gallensauren Salze, dann werden die Blutkörperchen total gelöst, und es bleiben keine Schatten übrig[2]).

Überdies ist das Eiweiß durch direkte Analyse der Schatten nachgewiesen worden.

Bei der Permeabilität der Blutkörperchen für nichtlipolytische Substanzen werden diese Eiweiße die Hauptrolle spielen. Wenn man diese Eiweiße also modifizieren könnte, so wäre zu erwarten, daß hierdurch die Permeabilität geändert würde.

Eine Modifikation der Eiweiße ist, wie allgemein bekannt, durch Säurezusatz leicht herzustellen.

Man muß sich also vorstellen, daß Säurezusatz zu Blut die eiweißartigen Komponenten der Wand der roten Blutkörperchen ändert und dadurch die Permeabilität für Ionen modifiziert. Daß Chloroformzusatz diese Permeabilität nicht ändert, beweist nicht, daß die Permeabilität gar nicht zu ändern ist.

---

[1]) Pascucci, Beiträge z. chem. Physiol. und Pathol. 6, 543.

[2]) Neufeld und Händel, zit. nach Höber.

Auf eine von Säuren modifizierte Permeabilität weisen schon die älteren Versuche von Hamburger[1]) hin, weil er durch Säurezusatz zu Blut eine geänderte Hämolyse unter Einfluß von hypotonischen Salzlösungen herstellen konnte.

Zusammenfassung.

Die Wasser- und Chlorverschiebung aus dem Serum nach den Blutkörperchen unter Einfluß von Säurezusatz zum Blute wird nicht verursacht durch eine größere Abspaltung diffusibler Ionen in den Blutkörperchen als in dem Serum, sondern sie wird bedingt durch eine Änderung der Permeabilität der Blutkörperchen, die durch Säure hervorgerufen wird.

---

[1]) Hamburger, Arch. f. [Anat. u.] Physiol. 1892.

Kurze Notiz über das Neutralrot-Papier als Indicator bei Alkalibestimmungen des Serums.

Von

J. Snapper.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Groningen.)

(Eingegangen am 8. April 1913.)

Die gebräuchliche Methode zur Gesamt-Alkalibestimmung des Serums ist die Loewysche[1]). Zum Serum wird so lange $^{n}/_{25}$-Weinsäure zugesetzt, bis ein Tropfen des Serum-Säure-Gemisches deutlich sauer reagiert gegen Lackmoid.

Man bringt dazu je einen Tropfen des Gemisches auf Lackmoid-Papier, bis das Gemisch einen deutlichen roten Fleck verursacht. Dann sind alle alkalibindenden Gruppen des Serums gesättigt.

Bei der Tüpfelmethode an sich macht man schon einen Fehler, weil man natürlich geringe Mengen der Flüssigkeit verliert.

Zum Serum kann man aber einen flüssigen Indicator direkt nicht zusetzen, weil der Umschlag durch die großen Eiweißmengen undeutlich wird.

Andererseits ist man in der Wahl des Indicators sehr beschränkt.

Die Substanzen im Serum, die alkalisch reagieren, sind vorwiegend $NaHCO_3$ und Na_2HPO_4, sehr schwach basische Körper.

Zur Titration kann man daher nur einen Indicator benützen, der schon bei einer sehr geringen Konzentration von OH-Ionen eine basische Reaktion angibt. Das Lackmoid ist dazu an und für sich ein sehr geeigneter Indicator.

---

[1]) Loewy, Arch. f. d. ges. Physiol. **58**, 1894.

Wir haben aber bei der Benützung von Lackmoid-Papier zur Serumtitration immer Schwierigkeiten gehabt, weil wir einen deutlichen Umschlag von Blau zu Rot nicht wahrnehmen konnten. Das von uns verwendete Lackmoid-Papier war von Merck bezogen.

Nach den Untersuchungen von Sörensen über die Indicatoren kann eigentlich das Lackmoid als Indicator bei Titration von eiweißhaltigen Flüssigkeiten nicht mehr benutzt werden, denn Sörensen hat gezeigt, daß unter den Indicatoren, deren Umschlagspunkt von Eiweiß beeinflußt wird, das Lackmoid gehört.

Der Umschlag des Lackmoids in eiweißhaltigen Flüssigkeiten ist unscharf.

Es wäre also möglich, daß für zwei Sera mit demselben Alkaligehalt, aber verschiedenem Eiweißgehalt, durch Titration mit Lackmoid-Papier ein verschiedener Alkaligehalt gefunden würde.

Auf Grund dieser theoretischen Betrachtungen und wegen der Schwierigkeiten, die die Titration mit Lackmoid-Papier mit sich bringt, haben wir versucht, ein anderes Indicatorpapier zusammenzustellen.

Bei der Wahl des Indicators mußte auf zwei Punkte geachtet werden:

1. Der Umschlagspunkt des Indicators mußte ungefähr bei derselben OH-Konzentration liegen, wie dies bei Lackmoid der Fall ist.

2. Der Umschlag des Indicators durfte von Eiweiß nicht beträchtlich beeinträchtigt werden.

Nach vielen vergeblichen Versuchen stellten wir uns Neutralrot-Papier her, das den zwei Bedingungen vorzüglich entspricht.

Als Stammlösung dient eine konzentrierte Neutralrot-Lösung in 50% Alkohol. Vor dem Gebrauch wird eine kleine Quantität davon 10 mal verdünnt mit 50% Alkohol, und mit dieser Lösung ein Filtrierpapier tüchtig getränkt. Das Papier wird dann eine halbe Stunde im Brutschranke getrocknet, danach ist es gebrauchsfertig.

Mit diesem Papier haben wir immer die Titration sowohl des Total-Alkalis als des diffusiblen Alkalis im Serum leicht und genau ausführen können.

Das Total-Alkali wird bestimmt durch unmittelbaren Zusatz der Weinsäure zum Serum; das diffusible Alkali durch Titration des alkoholischen Extraktes des Serums. In beiden Fällen ist der Umschlag scharf.

Das genannte Papier hat auch noch gegenüber dem Lackmoid-Papier den Vorzug, daß es, wie beschrieben, sehr leicht herzustellen ist. Man kann dadurch jeden Morgen in 1 Minute das Papier frisch anfertigen, das man den Tag über benutzen will.

Hierdurch wird man nicht belästigt von der Veränderlichkeit der Indicatorpapiere, die sich immer beim Aufbewahren einstellt. Beim Lackmoid-Papier stellte dies eine große Schwierigkeit dar.

Das Lackmoid-Papier selbst herzustellen, ist eine schwierige Aufgabe, die mehrere Tage erheischt.

Untersuchungen über die biologische Bedeutung und den Metabolismus der Eiweißstoffe.

VII. Der durch Formol titrierbare Aminosäurenstickstoff im Blutserum und in den Blutkörperchen von verschiedenen Tieren.

Von

A. Costantino.

(Aus dem Physiologischen Institut der K. Universität Neapel.)

(Eingegangen am 28. Februar 1913.)

I.

Als hauptsächlichsten Einwand gegen die von Fil. Bottazzi[1]) formulierte und unterstützte Theorie, der zufolge die normalerweise zur Ernährung der Gewebe bestimmten stickstoffhaltigen Substanzen nicht als fertige in der Darmwand gebildete Eiweißkörper (Abderhalden[2]) in die Zelle gelangen, sondern als Verdauungsprodukte des Nahrungseiweißes (Aminosäuren und Polypeptide), könnte man geltend machen, daß verschiedenen Autoren zufolge im Blute weder Aminosäuren noch Albumosen oder Peptone in bedeutender Menge gefunden werden.

Abgesehen von den älteren, aber sehr widersprechenden Beobachtungen von Embden und Knoop, Bergmann und Langstein, Kraus, Freund und Burchard hinsichtlich der Albumosen, ist neuerdings die Gegenwart von bestimmbaren Mengen von Aminosäuren im Blute gezeigt worden. Die neueren Versuche von van Slyke und Meyer beziehen sich besonders auf die als nutzbares Material im Blute vorkommenden Aminosäuren. Van Slyke und Meyer haben beobachtet, daß man im Blute von Hunden sowohl während der Verdauung, als auch wenn dieselben hungern, Aminosäuren findet, und zwar im ersteren Falle eine

[1]) Vgl. Rendic. R. Accad. d. Lincei (Sc. fis. nat. e mat.) 5, **19**, 1. Sem., 613, 1910, sowie die vorhergehenden Mitteilungen, besonders Nr. I Arch. di fisiol. **10**, 38, 1911. Die Mitteilungen II bis IV sind im Arch. di fisiol. **10**, 62, 1911; **10**, 129, 1912; **10**, 150, 1912; die Mitteilungen V und VI sind in Zeitschr. f. Biol. **57**, 365, 1911; **58**, 162, 1912 mitgeteilt.

[2]) E. Abderhalden, Synthese der Zellbausteine in Pflanze und Tier. Berlin 1912, S. 77 ff.

größere Menge als im zweiten. (Die von diesen Autoren angewandte Methode zur Bestimmung des Stickstoffs der Aminosäuren betrifft jedoch nicht ausschließlich diesen ebengenannten Stickstoff, sondern auch den vieler anderer stickstoffhaltigen Substanzen. Jedenfalls muß man die von denselben Autoren unter den von ihnen gewählten Bedingungen angewandte Methode als für jene Substanzen gut anwendbar betrachten.) Durch die Untersuchungen von van Slyke und Meyer ist diese Hypothese Abderhaldens als überflüssig erwiesen worden; sie würden eine positive Stütze der Ansicht Bottazzis bedeuten.

Übrigens sagen sie nichts über die Wichtigkeit, die den verschiedenen Blutbestandteilen bei Zufuhr von Aminosäuren zu den Geweben zukommt. Ich hielt es daher für nützlich, diese verschiedenen Probleme anzugreifen, indem ich mich derselben Methode bediente, die in den von mir in Gemeinschaft mit G. Buglia[1]) gemachten Untersuchungen über die quergestreiften und glatten Muskeln so ausgezeichnete Resultate gab. Die hier vorliegende Mitteilung enthält meine ersten Resultate betreffend die Verteilung des Aminosäurestickstoffs zwischen Blutkörperchen und Serum bei verschiedenen Tieren.

II. Methode.

Das eben dem Tiere entnommene Blut wurde defibriniert und ein Teil getrocknet im Trockenschrank bei 70°, ein anderer Teil zentrifugiert, um das Serum zu erhalten. Letzteres wurde ebenfals bei 70° getrocknet. Auf diese Weise wurden Trockenpulver sowohl des Gesamtblutes als auch des Serums hergestellt. In einigen Fällen wurde auch der Blutkörperchenbrei getrennt bei 70° getrocknet und analysiert, indem das defibrinierte Blut 2 Stunden lang zentrifugiert und das Serum soweit als möglich abgetrennt wurde.

Das Verhältnis von Blutserum zu Blutkörperchen wurde mittels der Methode von Hoppe-Seyler bestimmt, nur, daß in einem Versuch die Proteinsubstanzen direkt bestimmt wurden, in einem anderen dagegen indirekt.

In bezug auf die Bestimmungen des Aminosäurenstickstoffs in den verschiedenen Blutanteilen hielt ich mich an die Methode von Sörensen. Ich mache jedoch hierbei auf die von mir beobachtete Tatsache aufmerksam, daß man durch Zu-

[1]) G. Buglia und A. Costantino, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 130, 1912.

satz von sauren Alkaliphosphaten zu der Extraktionsflüssigkeit, wie man sie nach der Methode von Buglia und Costantino herstellt, eine genaue und schnelle Trennung der Proteine erzielt. Dies steht in Zusammenhang mit der Tatsache der ausgezeichneten Abtrennung der Proteine durch Bariumsalze in den quergestreiften Muskeln der höheren Tiere, da diese Extrakte eben schon beträchtliche Quantitäten anorganischer Phosphate enthalten.

Die angewandte Substanz war hinreichend, um zuverlässige Analysenresultate zu liefern. Sie wurde während 3 Stunden in einer wässerigen 10%igen Alkohollösung geschüttelt, deren Volumen sich auf 150 bis 200 ccm belief. Die zugefügten Bariumsalze betrugen ca. 3 bis 4 g $BaCl_2$ und 1 bis 2 g $Ba(OH)_2$ in Substanz. Um eine gute Trennung der Proteine zu erreichen, war es vorteilhaft, speziell bei dem Blutkörperchenbrei, 0,5 bis 1 g NaH_2PO_4 zu der Extraktionsflüssigkeit zuzufügen.

In gewissen Fällen, in denen die Extraktionsflüssigkeit nicht deutlich alkalische Reaktion zeigte, wurde das erste Filtrat mit gesättigter Barytlösung stark alkalisch gemacht und von neuem filtriert. Die zur Analyse verwandten Flüssigkeiten waren stets völlig klar und kaum gefärbt.

Die in folgender Tabelle vereinigten Zahlen bedeuten den durch Formol titrierbaren Aminosäurenstickstoff, nach Abzug des Ammoniakstickstoffs. Die der zu untersuchenden Flüssigkeit zugefügte Menge 0,5%iger Phenolphthaleinlösung (in 50%igen Alkohol) betrug 2 ccm pro 100 ccm Flüssigkeit. Bei Titrierung der Aminosäuren nach der Formolmethode wurde $^n/_5$-NaOH (CO_2-frei) benutzt. In diesen Versuchen wurden auch Bestimmungen der Trockensubstanz und des Gesamtstickstoffs gemacht. Untersucht wurde das Blut vom Hund, Schwein und Truthahn.

III. Analytische Belege.

A. Säugetiere.

I. Hundeblut 1.

Das Tier befand sich in voller Verdauung. (Carotisblut.)

a)

4,8095 g Blut gaben 0,8748 g Eiweiß und Hämoglobin . . . = 18,60%
4,9578 g Blut, vom Serum befreit, gaben 0,7566 g Eiweiß und Hämoglobin . . . . = 15,27%
4,5303 g Serum gaben 0,2808 g Eiweiß . . . . = 6,24%

Berechnung des Verhältnisses von Serum und Blutkörperchen im Gesamtblute:

$$\frac{18,60 - 15,27}{6,24} \cdot 100 = 53,3.$$

100 Gewichtsteile des defibrinierten Blutes enthalten: 46,7 g Blutkörperchen und 53,3 g Serum.

b)

	Wasser	Feste Stoffe	Gesamt-N	Durch Formol titrierbarer Aminosäuren-N		
				Trocken-substanz analysiert	$\frac{NaOH}{5}$ verbraucht	100 Gewichtsteile Aminosäuren-N enthalten
	% g	% g	% g	g	ccm	
Blut	78,03	21,97	3,27	25,82	3,1	0,0098
Serum	91,72	8,18	1,03	14,43	1,0	0,0027
Blutkörperchen (berechnet)	65,08	34,90	6,13	—	—	0,0187

II. Hundeblut 2.

Das Tier befand sich in voller Verdauung. (Ar. carotis.)

a)

	Wasser	Feste Stoffe	Gesamt-N	Durch Formol titrierbarer Aminosäuren-N		
				Trocken-substanz analysiert	$\frac{NaOH}{5}$ verbraucht	100 Gewichtsteile Aminosäuren-N enthalten
	% g	% g	% g	g	ccm	
Blut	78,78	21,12	3,46	20,95	1,85	0,0105
Serum	92,80	7,72	0,96	10,33	1,55	0,0042

III. Schweineblut 1.

(Hungernd oder in Verdauung begriffen?)

a)

Bestimmung des durch Formol titrierbaren Aminosäure-N, nach der Hydrolyse mit 0,25% Salzsäure (ca. 24 Stunden). (Die unten wiedergegebenen Zahlen zeigen die Möglichkeit, das Verhältnis des Proteingehaltes der verschiedenen Blutbestandteile leicht zu entnehmen.)

2,7493 g Blut gaben 0,0636 g Aminosäuren-N . . . . . . = 2,28 %
2,2767 g Blut, vom Serum befreit, gaben 0,0410 g Aminosäuren-N . . . . = 1,80 %
3,6995 g Serum gaben 0,0310 g Aminosäuren-N . . . . . . = 0,8379%

Berechnung des Verhältnisses von Serum und Blutkörperchen im Gesamtblute:

$$\frac{2,28 - 1,80}{0,8379} \cdot 100 = 57,28.$$

100 Gewichtsteile des defibrinierten Blutes enthalten: 42,72 g Blutkörperchen und 57,28 g Serum.

	Wasser	Feste Stoffe	Gesamt-N	Durch Formol titrierbarer Aminosäuren-N		
				Trockensubstanz analysiert	$\frac{NaOH}{5}$ verbraucht	100 Gewichtsteile Aminosäuren-N enthalten
	°/o g	°/o g	°/o g	g	ccm	
Blut	77,99	22,01	3,40	27,94	2,8	0,0109
Serum	90,69	9,31	1,21	16,00	1,9	0,0054
Blutkörperchen (berechnet)	60,95	38,95	6,33	—	—	0,0182
Blutkörperchen (direkt bestimmt)	64,79	35,21	5,69	19,408	1,35	0,0195

IV. Schweineblut 2.
(Hungernd oder in Verdauung begriffen?)
a)

	Wasser	Feste Stoffe	Gesamt-N	Durch Formol titrierbarer Aminosäuren-N		
				Trockensubstanz analysiert	$\frac{NaOH}{5}$ verbraucht	100 Gewichtsteile Aminosäuren-N enthalten
	°/o g	°/o g	°/o g	g	ccm	
Blut	77,39	21,61	—	—	—	—
Serum	91,41	8,59	1,14	18,28	1,9	0,0032
Blutkörperchen (direkt bestimmt)	65,11	34,89	5,77	26,26	2,1	0,0182

B. Vögel.

V. Truthahnblut.

(Hungernd oder in Verdauung begriffen?)

Blut von vier Tieren wird durch Natriumoxalat inkoagulabel gemacht (0,5 pro 500 ccm Blut).

	Wasser	Feste Stoffe	Gesamt-N	Durch Formol titrierbarer Aminosäuren-N		
				Trockensubstanz analysiert	$\frac{NaOH}{5}$ verbraucht	100 Gewichtsteile Aminosäuren-N enthalten
	°/o g	°/o g	°/o g	g	ccm	
Blut	78,55	21,45	3,29	27,26	3,4	0,0204
Serum	91,34	6,86	0,856	15,70	1,3	0,0028
Blutkörperchen (direkt bestimmt)	62,83	37,17	6,01	{ 30,05 26,27	4,9 3,7	0,0344 0,0335

	Hund I	Hund II	Schwein I		Schwein II	Truthahn
I. 1000 Gewichtsteile Blut enthalten:						
Wasser	780,1	787,8	779,9		773,9	785,5
Feste Stoffe	219,7	211,2	220,1		226,1	214,5
Gesamt-N	32,9	34,6	34,0		—	32,9
Aminosäuren-N (durch Formol titrierbar) .	0,098	0,105	0,109		—	0,204
II. 1000 Gewichtsteile Serum enthalten:						
Wasser	918,2	928,0	906,9		914,1	913,4
Feste Stoffe	81,8	77,2	93,1		85,9	68,6
Gesamt-N	10,3	9,6	12,1		11,4	8,56
Aminosäuren-N (durch Formol titrierbar) .	0,027	0,042	0,054		0,032	0,028
III. 1000 Gewichtsteile Blutkörperchen enthalten:						
	berechnet		berechnet	direkt bestimmt	direkt bestimmt	direkt bestimmt
Wasser	650,8	—	609,5	647,9	651,1	628,3
Feste Stoffe	349,0	—	389,5	352,1	348,9	371,7
Gesamt-N	61,3	—	63,3	56,9	57,7	60,1
Aminosäuren-N (durch Formol titrierbar) .	0,187	—	0,182	0,195	0,182	0,344 0,335

Schlußfolgerungen.

1. Sowohl im Serum als in den Blutkörperchen findet sich mit Formol titrierbarer Aminosäurenstickstoff.

2. Die Quantität desselben ist sehr gering im Serum, relativ groß dagegen in den Blutkörperchen.

3. In den von mir untersuchten kernfreien Blutkörperchen ist die Menge des durch Formol titrierbaren Aminosäurenstickstoffs um ungefähr die Hälfte geringer als in den kernhaltigen Blutkörperchen; dagegen ist die Menge des Aminosäurenstickstoffs im Serum bei Säugetieren und beim Truthahn nahezu gleich.

Aus den Versuchen folgt daher in überzeugender Weise das Vorherrschen der Aminosäuren in den Blutkörperchen gegenüber dem Serum. Diese Versuche über den Gehalt an Aminosäuren des Blutes richten zum erstenmal die Aufmerksamkeit auf die Blutkörperchen. Ob der hohe Gehalt an Aminosäuren auf einen den Blutkörperchen eigenen Stoffwechsel zu beziehen ist, oder ob vielmehr die Blutkörperchen, die Aminosäure den Bau der Gewebe befördern, wird sich aus meinen späteren Untersuchungen ergeben.

Über die Zersetzung der Milchsäure und Weinsäure im ultravioletten Licht.

Von

H. Euler und S. Ryd.

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Hochschule Stockholm.)

(Eingegangen am 18. April 1913.)

Mit 2 Figuren im Text.

Vor einiger Zeit haben Euler und Lindberg[1]) festgestellt, daß die Milchsäure im ultravioletten Licht eine Spaltung erleidet, die der bekannten Gärungsreaktion

$$C_3H_6O_3 = CO_2 + C_2H_5.OH$$

entspricht. Wesentlich war dabei der Befund, daß als Zwischenprodukt Ameisensäure und Acetaldehyd auftreten, die ihrerseits im ultravioletten Licht schnell zu Alkohol und Kohlensäure umgewandelt werden.

Die Versuchsanordnung war die folgende:

Die zu belichtende Lösung befand sich in Gefäßen aus durchsichtigem Quarz in einer Schicht von nur 3 mm Dicke. Dieses Gefäß befand sich in einem Abstand von 55 mm von der Lichtquelle, einer Quecksilberquarzlampe von Heraeus, die mit einem Strom von 2,5 Ampère brannte. Die belichtete Lösung hielt sich, wenn nicht gekühlt wurde, während der gesamten Reaktionsdauer auf einer Temperatur von 75°. Es waren durchweg reine, wässerige Milchsäurelösungen zur Anwendung gekommen, denen kein metallischer Katalysator zugesetzt worden war.

Daß der Zerfall der Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure sich unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 311, 1911 und diese Zeitschr. **39**, 410, 1912.

in ähnlicher Weise vollzieht wie unter der Mitwirkung von Gärungsenzymen, ist wegen der im Licht auftretenden Stoffe, Ameisensäure und Acetaldehyd, die nunmehr ziemlich allgemein als Zwischenprodukte der Gärungsspaltungen angesehen werden, recht wahrscheinlich.

Wir berichten hier kurz über einige neue Versuchsreihen, die wir hinsichtlich der Bedingungen der Lichtspaltung angestellt haben, hauptsächlich in der Absicht, um über den Zusammenhang der oben erwähnten Reaktion mit biochemischen Vorgängen Anhaltspunkte zu gewinnen.

Die von Euler und Lindberg gewählten Versuchsbedingungen weichen ja in mehrfacher Hinsicht von den in der Natur herrschenden ab. Wenn deswegen die biologische Verwertbarkeit der in Rede stehenden Ergebnisse wohl nicht diskutiert zu werden braucht[1]), so ist doch andererseits nichts dagegen einzuwenden, wenn Neuberg[2]) es besonders betont, daß die Versuche von Euler und Lindberg bei hoher Temperatur und bei intensivem Quecksilberlicht ausgeführt worden sind.

Die in der Mitteilung von Euler und Lindberg angegebenen Resultate über die Zersetzung der Milchsäure beziehen sich auf eine Temperatur von 75°. Frühere vorläufige Versuche über den Verlauf der gleichen Reaktion bei 30° wurden nun erweitert und exakter durchgeführt. Neue Parallelversuche wurden bei der Temperatur 75° ausgeführt, und zwar un-

---

[1]) Die Aufklärung biochemischer Reaktionen erfolgt ja sicher nicht ausschließlich durch Versuche, die unter den in der Natur herrschenden Bedingungen angestellt werden. Vielmehr wird hier, wie in allen anderen Gebieten der physiologischen Chemie, gerade eine Variation der Reaktionsbedingungen, bzw. eine Verstärkung des einen oder anderen Einflusses zu einem Verständnis für den im lebenden Organismus verlaufenden Vorgang führen. So verdanken wir gerade den photochemischen Arbeiten von Neuberg (diese Zeitschr. **13**, 305, 1908 und **29**, 279, 1910) neue, auch in biochemischer Hinsicht sehr wertvolle Ergebnisse, obwohl sie größtenteils mit Katalysatormengen angestellt sind, die in der lebenden Natur nicht vorkommen. In neuester Zeit hat indessen Neuberg in einer Schrift: Über die photokatalytischen Wirkungen des Pyrmonter Eisenwassers (Zeitschr. f. Balneolog. **5**, 561, 1913) auch Versuche angegeben, bei denen die vorhandenen Eisenmengen sehr klein waren (die Lösungen waren $^{n}/_{2000}$ in bezug auf Ferrosalz).

[2]) Diese Zeitschr. **39**, 158, 1912.

mittelbar vor und nach der bei 30° angestellten Serie, da sich die chemische Wirksamkeit der Lampe mit der Zeit ändert. Abgesehen von der Temperatur waren alle Bedingungen bei beiden Versuchsreihen die gleichen. In der folgenden Tabelle I geben wir zwei von unseren Beobachtungsreihen an. In der Spalte 3 ist ein Parallelversuch aufgenommen, bei dem eine 0,5 n-Milchsäurelösung gleichzeitig 0,5 normal in bezug auf H_2SO_4 war.

Tabelle I.

Zeit in Stunden	1 n-Milchsäure bei 75°		1 n-Milchsäure bei 30°		$^n/_2$-Milchsäure + $^n/_2$-H_2SO_4	
	Induktionszeit: 1 St.		Induktionszeit: 2,5 St.		Induktionszeit: 1,5 St.	
	ccm	Diff.	ccm	Diff.	ccm	Diff.
0,25	4,5		0,9		1,8	
0,50	6,2	1,7	2,3	1,4	3,5	1,7
0,75	7,8	1,6	3,7	1,4	5,0	1,5
1,00	9,5	1,7	5,0	1,3	6,7	1,7
1,25	11,2	1,7	6,5	1,5	8,6	1,9
1,50	12,8	1,6	7,8	1,3	10,2	1,6
1,75	14,5	1,6	9,1	1,3	11,4	1,2
2,00	16,1	1,6	10,4	1,3	12,8	1,4
2,25	17,7	1,6	11,7	1,3	14,7	1,9
2,50	19,3	1,6				
2,75	20,9	1,6				

Die beobachteten Geschwindigkeiten traten nicht sofort auf, sondern erst nach Verlauf einer Induktionszeit, die in der Tabelle I angegeben ist.

Zunächst überzeugten wir uns, daß die Temperatur von 75° an sich im Dunkeln keine Spaltung der Milchsäure hervorruft. Unser zu den Lichtversuchen angewandtes Quarzgefäß wurde in einem Wasserbad während $1^1/_2$ Stunden bei 80° gehalten, ohne daß die geringste Gasentwicklung eintrat. Auch als die in Spalte 3 untersuchte schwefelsäurehaltige Milchsäurelösung im Dunkeln auf 80° erwärmt wurde, trat keine Gasentwicklung auf. Die von uns studierte Reaktion ist also ein reiner Lichteffekt. Der Vergleich der Spalten 1 und 2 und

die Kurven in Fig. 1 zeigen, daß der Temperaturkoeffizient der Lichtreaktion sehr gering ist. Daß der Temperaturkoeffizient der Lichtreaktionen erheblich kleiner ist als derjenige bei Dunkelreaktionen, ist ja eine nunmehr allgemein bekannte Regelmäßigkeit. Im vorliegenden Falle ist jedoch der Einfluß der Temperatur ganz auffallend minimal, die Reaktionsgeschwindigkeit steigt bei einer Temperaturerhöhung um 10° nur im Verhältnis 1:1,04. Auch die in der früheren Arbeit von Euler und Lindberg bei 75° untersuchte Spaltung der Milchsäure im Licht verläuft also bei gewöhnlicher Temperatur nur um höchstens 25 % langsamer als bei der Versuchstemperatur von 75°.

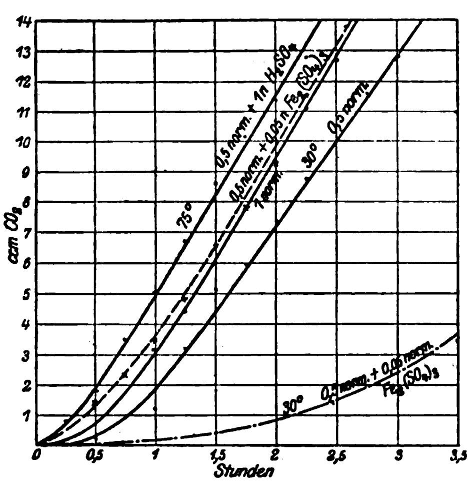


Fig. 1. Milchsäure.

Die von Euler und Lindberg gewählte Versuchstemperatur steht also einem direkten Vergleich zwischen der studierten Lichtreaktion und dem entsprechenden biochemischen Vorgang durchaus nicht im Wege.

Was den Einfluß der Wellenlänge des ultravioletten Lichtes betrifft, so haben bereits Euler und Lindberg betont, „daß eine ganze Reihe von Lichtreaktionen nur unter dem Einfluß der kurzwelligen ultravioletten Strahlen eintreten, die von Glas außerordentlich stark absorbiert werden. Es wurde deshalb in Gefäßen aus reinstem, durchsichtigem Quarz gearbeitet". Daß dasjenige Gebiet der ultravioletten Strahlen, das von Glas so gut wie vollständig absorbiert wird, auch von Luft in erheblichem Grade aufgehalten wird und deshalb die Atmosphäre keineswegs unbehindert passiert, ist wohl eine so allgemein bekannte Tatsache, daß dieselbe kaum eigens betont zu werden braucht.

Wir haben uns nochmals davon überzeugt, daß diejenigen Strahlen, welche die Zersetzung von Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure hervorrufen, durch eine 1 mm dicke Glasscheibe so gut wie vollständig absorbiert werden. Auch die Zwischenschaltung einer 0,8 mm dicken planparallelen Uviolglasplatte bewirkt eine Schwächung des photochemischen Effektes der von der Quarzlampe ausgesandten Strahlen um etwa 75 %.

Da nur die kürzesten ultravioletten Strahlen eine rasche Spaltung der Milchsäure hervorrufen, und da andererseits diese Strahlen auch von der Quarzlampe selbst am leichtesten absorbiert werden, so vermindert sich die photochemische Wirksamkeit der Quarzlampe mit zunehmender Benützungsdauer, da selbst bei sorgfältiger Behandlung der Lampe die Durchlässigkeit der Quarzröhre allmählich abnimmt. Mit älteren Quarzlampen werden schlechte Resultate erhalten.

Die Tatsache, daß durch Bestrahlung reiner Milchsäurelösungen die typische Gärungsspaltung hervorgerufen wird, scheint uns durch den Umstand, daß nur kurzwellige Strahlen hierbei wirksam sind, nicht an Interesse zu verlieren. Es kann ja wohl keinem Zweifel unterliegen, daß die Aufteilung der Milchsäure in Alkohol und Kohlensäure im Pflanzen- und Tierkörper unter der Vermittlung von spezifischen Enzymen eintritt, daß also diese Reaktion weder im Pflanzen- noch im Tierkörper als photochemische Wirkung längerer oder kürzerer Strahlen auf die Milchsäure angesehen werden kann.

Aber wie der von Schade, Buchner und Meisenheimer geführte Nachweis, daß die Spaltung des Traubenzuckers in Alkohol und Kohlensäure auch durch anorganische Katalysatoren durchgeführt werden kann, das Interesse der Biochemiker erregt hat, obgleich weder in der Hefe noch im Tierkörper metallisches Rhodium nachgewiesen worden ist, so dürfte der Befund, daß Milchsäure in rein wässeriger Lösung durch einfache Bestrahlung über Acetaldehyd und Ameisensäure in Alkohol und Kohlensäure zerfällt, einen Beitrag zur Kenntnis der typischen Gärungsreaktion liefern, besonders in Verbindung mit dem im hiesigen Laboratorium von Herrn Y. Dalström gewonnenen Ergebnis, daß bei der Bestrahlung der Glucose mit ultraviolettem Licht Milchsäure auftritt.

Unsere neuen Messungen hatten bestätigt, daß die Spaltung

der Milchsäure durch Mineralsäuren beschleunigt wird. Wir haben nun weitere Katalysatoren dieser Lichtreaktion untersucht, besonders Eisen- und Mangansalze, und zwar in erster Linie in Rücksicht auf die interessanten Beobachtungen von Neuberg über die Einwirkung dieser Metallsalze auf photochemische Reaktionen.

Die dabei gewählten Versuchsbedingungen schlossen sich unseren früheren an, der Abstand des Reaktionsgefäßes von der Lampe betrug 5 cm, die Versuchstemperatur 75° und 30°.

Tabelle II.

Belichtete Lösung: 10 ccm 1 n-Milchsäure + 1 ccm 0,1 n-$Fe_2(SO_4)_3$.

Zeit in Stunden	75°		30°	
	Induktionszeit: 1,5 Std.		Induktionszeit: 3 Std.	
	ccm CO_2	Diff.	ccm CO_2	Diff.
0,50	4,8		—	
		1,7		
0,75	6,6		4,25	
		1,7		1,50
1,00	8,2		5,75	
		1,7		1,70
1,25	9,9		7,45	
		1,7		1,70
1,50	11,6		9,15	
		1,8		1,65
1,75	13,4		10,70	
		1,8		1,15
2,00	15,2		11,85	
		1,6		0,80
2,25	16,8		12,65	
		1,4		1,00
2,50	18,2		13,65	
		1,3		1,10
2,75	19,5		14,75	
				0,90
3,00	—		15,65	

Ein Vergleich der Tabelle II mit der Tabelle I zeigt, daß die Kohlensäureentwicklung durch die recht erhebliche Menge Ferrisulfat (1 Äquiv. auf 100 Äquv. Milchsäure) nicht nur gar nicht beschleunigt, sondern sogar verzögert wurde (siehe die betreffenden Kurven in Fig. 1). Die ganze Reaktion fiel in Gegenwart des Eisensalzes unregelmäßiger aus.

Nach der Belichtung wurde die Lösung auf Ferriionen geprüft. Dieselben waren ganz verschwunden und alles Eisen war in zweiwertigem Zustande vorhanden, wie direkt nachgewiesen wurde. Das Eisen hatte also gegenüber der Milchsäure als Oxydationsmittel gewirkt, und der photochemische

Vorgang ist also in Gegenwart von Eisensalz wenigstens teilweise ein ganz anderer als in reiner wässeriger Lösung. Anhaltspunkte dafür, daß diese unter Vermittlung von Eisensalzen verlaufende Veränderung der Milchsäure mit der enzymatischen Spaltung der Milchsäure eine Ähnlichkeit besitzt, liegen bis jetzt wenigstens kaum vor.

Mangansulfat ruft nach einer vorläufigen Untersuchung von Herrn H. Cassel eine, wenn auch geringe, Beschleunigung der photochemischen Milchsäurespaltung hervor.

Versuche mit Weinsäure.

Die photochemische Spaltung reiner organischer Säuren wurde von uns an Weinsäure eingehend studiert, insbesondere hinsichtlich katalytischer Einflüsse.

Bei einem Abstand der bestrahlten Lösung von 50 mm von der Heraeuslampe und einer Temperatur von 75° wurden folgende Zahlen für die entwickelte Kohlensäure erhalten:

Tabelle III.

Versuchszeit in Stunden	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
1 n-Weinsäure	1,2	2,1	6,3	9,5	13,4	17,3	20,9	24,3	28,8	32,6	36,2
0,5 n-Weinsäure	1,5	3,1	6,0	8,7	11,0	13,9	16,7	18,8	22,1	24,4	26,7
0,5 n-Weinsäure, 0,1 n-NaCl	1,5	—	6,0	—	11,0	—	—	—	—	—	—
0,5 n-Weinsäure, 1 n-$MgSO_4$	1,3	2,2	4,2	6,2	8,5	10,7	13,0	14,9	17,1	18,9	22,1

Aus der verdünnteren Weinsäurelösung wurde in der gleichen Zeit prozentisch bedeutend mehr Kohlensäure entwickelt als aus der konzentrierteren. Es hat dies offenbar seinen Grund in der starken Absorptionsfähigkeit der Lösung für kurze ultraviolette Strahlen; wegen dieser Absorption werden nur die der Lichtquelle nächstliegenden Schichten mit den wirksamen Strahlen gesättigt.

Wird der Weinsäurelösung eine neutrale Substanz zugesetzt, welche die ultravioletten Strahlen stark absorbiert, so tritt ebenfalls eine Verminderung der Spaltungsgeschwindigkeit ein, wie der in der 4. Zeile der obigen Tabelle angegebene Versuch zeigt.

Der letzterwähnte Versuch zeigt folgendes: Wenn diejenigen Strahlen, die einem gelösten Stoff gegenüber photochemisch wirksam sind, in der Lösung dieses Stoffes durch einen zweiten, chemisch mit dem ersten nicht reagierenden Stoff absorbiert werden, so wird durch diese Absorption keine Erhöhung der photochemischen Zersetzung des ersteren Stoffes hervorgerufen.

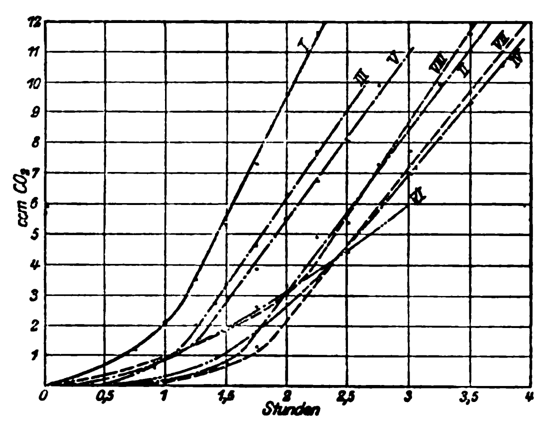


Fig. 2. Weinsäure.

I = 1 n-Weinsäure.
II = 0,5 n-Weinsäure.
III = 1 n-Weinsäure + 0,1 n-$MnSO_4$ (gleiche Teile).
IV = 1 n-Weinsäure + 0,2 n-$FeSO_4$ („ „).
V = 1 n-Weinsäure + 0,1 n-$FeSO_4$ („ „).
VI = 1 n-Weinsäure + 1 n-$FeSO_4$ („ „).
VII = 10 ccm 1 n-Weinsäure + 1 ccm 0,1 n-$FeSO_4$.
VIII = 10 ccm 1 n-Weinsäure + 1 ccm 0,1 n-$Fe_2(SO_4)_3$.

Eine „optische Sensibilisierung“ in diesem Sinne findet also nicht statt.

Die Sensibilisierung besteht vielmehr wohl immer darin, daß der photokatalytisch wirkende Sensibilisator selbst vorübergehend oder dauernd verändert wird, wobei das unter dem Einfluß des Lichtes gebildete Produkt auf das eigentliche Lichtsubstrat einwirkt. Sind die angewandten Mengen des Sensibilisators von derselben Größenordnung wie diejenigen des Lichtsubstrates, so besteht die Möglichkeit, daß das Licht eine zwischen beiden Stoffen nach stöchiometrischen Gesetzen vorsichgehende Reaktion beschleunigt.

Nach den von Neuberg (l. c.) an zahlreichen organischen Stoffen beobachteten Lichtkatalysen durch Eisensalze im Sonnen-

licht, hätte man nun von vornherein erwarten können, daß die Abspaltung der Kohlensäure aus Weinsäure durch Eisensalze auch im Licht der Quecksilberlampe erheblich beschleunigt wird. Die folgende Tabelle und die Kurve der Fig. 2 zeigen indessen, daß dies nicht der Fall ist. Nur beim Versuch 7 trat nach 2 Stunden in Gegenwart von 0,01 norm. $FeSO_4$ eine etwas größere Kohlensäuremenge auf als beim eisenfreien Parallelversuch. Sonst bewirkte $FeSO_4$ im Gegenteil eine geringfügige Verzögerung der beobachteten Lichtreaktion.

Mangansulfat verhielt sich ähnlich (s. Versuch 4), während Uranyl (Versuch 5 und 6), welches ja seit Seekamp als Photokatalysator für organische Säuren bekannt ist, die Abspaltung der Kohlensäure deutlich befördert.

Tabelle IV.

	Versuchszeit in Stunden	Induktionszeit	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
0,5 n-Weinsäure	Ohne Zusatz	1,5	3,1	6,0	8,7	11,0	13,9	16,7	18,8	22,1
	1. mit 0,05 n-$FeSO_4$ . .	1,7	2,8	5,5	8,1	10,8	—	—	—	—
	2. „ 0,1 „ „ . .	1,1	1,8	3,5	5,9	8,1	10,5	12,7	—	—
	3. „ 0,5 „ „ . .	0,4	0,9	2,0	3,1	4,5	—	—	—	—
	4. „ 0,05 „ $MnSO_4$ . .	0,8	2,0	4,6	7,7	—	—	—	—	—
	5. „ 0,05 „ Uranylnitrat	2,1	6,2	10,4	12,1	—	—	—	—	—
	6. „ 0,01 „ „	0,3	1,5	4,0	6,6	8,9	—	—	—	—
1 n-Weinsäure	Ohne Zusatz	—	—	6,3	9,5	13,4	17,3	20,9	24,3	28,8
	7. mit 0,01 n $FeSO_4$.	—	0,1	2,0	7,7	11,3	15,4	21,4	27,7	34,0

Das Uranylsalz selbst beteiligt sich dabei an der Reaktion in einer Weise, die im hiesigen Laboratorium näher studiert wird.

Wird eine Weinsäurelösung belichtet, die Ferrisalz enthält, so wird die Entwicklung der Kohlensäure etwas mehr beschleunigt, als dies in Anwesenheit von Ferrosalz der Fall ist. Dabei wird das Ferrisalz reduziert, so daß bei unseren mit 1 n-Weinsäure angestellten Versuchen nach 4 Stunden keine Ferri-Ionen mehr nachweisbar waren. Gleichzeitig bildet sich in der Weinsäurelösung eine reduzierende Substanz, wie dies auch bei den oben angegebenen Versuchen mit Milchsäure der Fall ist.

Die Bildung reduzierender Substanzen bei der Belichtung eisenhaltiger Milchsäurelösungen durch Sonnenlicht hat auch Neuberg beobachtet.

Die Zersetzungen der aliphatischen Oxysäuren im Lichte sind in Gegenwart von Eisensalzen offenbar ziemlich komplizierte Vorgänge, die ihrer Natur nach teils Oxydationen, teils katalytische Spaltungen darstellen.

Die gegenseitigen Beziehungen dieser Vorgänge werden in Rücksicht auf die Theorie der Sensibilisatoren näher untersucht werden.

Zusammenfassung.

Milchsäure erleidet, wie früher gezeigt wurde, durch kurze, ultraviolette Strahlen eine Spaltung, die der Gärungsspaltung dieser Säure analog sein dürfte; dieselbe wird von der Temperatur noch weniger beeinflußt, als andere bisher studierte photochemische Reaktionen.

Die Kohlensäureabspaltung aus Milchsäure wird bei den von uns gewählten Versuchsbedingungen weder durch Ferro- noch durch Ferrisalze beschleunigt. Letztere werden bei der Belichtung in Milchsäurelösungen rasch reduziert.

Auch aus Weinsäure wird durch kurze, ultraviolette Strahlen Kohlensäure abgespalten und gleichzeitig eine reduzierende Substanz gebildet.

Ferrosalze wirken auf diese Reaktion nicht beschleunigend, Ferrisalze steigern die Kohlensäureentwicklung, während sie selbst reduziert werden.

Untersuchungen über die fermentativen Eigenschaften des Blutes. I.

Über ein peptolytisches Ferment des normalen Hundeserums.

Von

Ludwig Pincussohn.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 23. April 1913.)

Die Untersuchungen Abderhaldens und seiner Mitarbeiter[1]) haben ergeben, daß die Sera oder Plasmen des Blutes normaler Tiere nur teilweise imstande sind, einfach zusammengesetzte Polypeptide abzubauen. Es fanden sich bei den einzelnen Tierarten Unterschiede, indem z. B. das Plasma des Kaninchens das Dipeptid Glycyl-l-Tyrosin sehr rasch in seine Komponenten aufzuspalten vermochte, während das Serum des Hundes ohne jeden Einfluß auf diese Verbindung blieb. Es war besonders dieser Umstand, der Abderhalden und Pincussohn veranlaßte, zu den Versuchen über den Einfluß der parenteralen Einverleibung artfremder Eiweißstoffe auf das Blutplasma bzw. Blutserum den Hund als Versuchstier zu wählen. Aus dieser Arbeit sowie einer Reihe weiterer Publikationen derselben Autoren und Abderhaldens mit einer Reihe anderer Mitarbeiter ergab sich nun, daß nach Injektion verschiedenartigster Eiweißkörper, wie Seidenpepton, Eiereiweiß, Serum, Pflanzeneiweiß, das Plasma bzw. Serum des Hundes mit einer fermentativen Fähigkeit begabt wurde, und daß es nun imstande war, das Dipeptid Glycyl-l-Tyrosin aufzuspalten. Andererseits ist aber das normale Hundeserum bereits imstande, höher

[1]) Zusammenstellung der einschlägigen Literatur in Abderhalden, Schutzfermente des tierischen Organismus. Berlin 1912; Pincussohn, Über fermentative Eigenschaften des Blutes und der Gewebe. Centralbl. f. Physiol. 31, Nr. 19, 1911.

zusammengesetzte Polypeptide zu zerlegen. Nach den Angaben von Abderhalden und Pincussohn[1]) wird das Tripeptid Diglycylglycin schon von normalem Hundeplasma aufgespalten, und es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß sich noch mehrere Polypeptide finden lassen, die von Hundeserum bzw. Plasma abgebaut werden können, während voraussichtlich eine Reihe anderer Polypeptide sich, ähnlich wie das Glycyl-l-Tyrosin, refraktär verhalten werden.

Zur Verfolgung dieses Abbaues hat sich als außerordentlich praktisch die sogenannte optische Methode erwiesen, die, von E. Fischer eingeführt, besonders von Abderhalden und seinen Mitarbeitern für viele Fragestellungen mit Erfolg benutzt worden ist. Um die abbauenden Fähigkeiten der Blutflüssigkeit unter verschiedenen Bedingungen zu prüfen, wurde in weiteren Versuchen, besonders aus äußeren Gründen, das Dipeptid bzw. Polypeptid ersetzt durch ein auf durchaus gleichmäßige Art hergestelltes Pepton, und es fand sich, daß dieselben Ergebnisse wie mit den synthetischen Polypeptiden mit Peptonen erhalten wurden, die man aus verschiedenen Eiweißstoffen, in erster Linie Seide, dann Eiereiweiß, Casein usw. darstellte. Es ergab sich bei diesen Versuchen eine weitgehende Nichtspezifizität der durch parenterale Eiweißinjektion erworbenen fermentativen Fähigkeit der Blutflüssigkeit: ob man Seidenpepton, Eiereiweiß, Casein, Gliadin injizierte, in allen Fällen wurde ein aus den verschiedensten Eiweißkörpern hergestelltes Pepton in gleicher Weise abgebaut. Ebenso regelmäßig ergab sich, daß das Plasma oder Serum der nichtbehandelten Hunde die verschiedenartigen Peptone, ebensowenig wie das Dipeptid Glycyl-l-Tyrosin, zu verändern vermochte.

Im Organismus findet bekanntlich ein Abbau der Eiweißkörper statt. Abgesehen von dem Abbau des Nahrungseiweißes durch die Fermente der Verdauungsdrüsen muß wohl zweifellos auch das Zelleiweiß, wenn die Zelle ihre Tätigkeit erfüllt hat und abstirbt, abgebaut werden: wir finden ja in den Ausscheidungen nur noch tiefe, stark veränderte Spaltprodukte des Eiweißmoleküls. Wo die Fermente sitzen, die den Abbau des

[1]) Abderhalden und Pincussohn, Über den Gehalt des Kaninchen- und Hundeplasmas an peptolytischen Fermenten unter verschiedenen Bedingungen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **61**, 200, 1909.

Zelleiweißes besorgen, darüber ist bisher Genaues nicht bekannt. Wir wissen nur, daß durch Autolyse ein solcher Abbau stattfinden kann, ohne aber, vielleicht abgesehen von einzelnen pathologischen Verhältnissen, orientiert zu sein, welche Rolle dieser Prozeß im lebenden Organismus spielt und bis zu welchen Spaltprodukten er verläuft. Der Sitz der autolytischen Fermente dürfte wohl die Zelle selbst sein. Es ist aber nicht unwahrscheinlich, daß mehr oder weniger hohe Eiweißabbauprodukte der Zelle in die Blutbahn hereingeschwemmt werden, und man müßte dann wohl annehmen, daß hier ein mehr oder weniger starker weiterer Abbau einsetzt. Es handelt sich hier um einen durchaus physiologischen Vorgang. Während des ganzen Lebens wahrscheinlich, wenn auch vielleicht in wechselnder Intensität, werden mehr oder weniger hohe Komplexe in die Blutbahn eingeschwemmt, und wir werden daher Fermente, die hier eingreifen, während der meisten Zeit des Lebens erwarten müssen. Das Gleichnis Emil Fischers von dem Zusammenpassen von Ferment und Substrat wie von Schlüssel und Schloß werden wir auch hier anwenden können. In einem auf der Grenze des Physiologischen stehenden Vorgang, der Schwangerschaft, haben Abderhalden, Freund und Pincussohn[1]) gezeigt, daß im Blutserum von Schwangeren Fermente auftreten, die sich ganz spezifisch gegen Placentagewebe bzw. dessen Abbauprodukte richten, was leicht von der Theorie aus zu verstehen ist, daß bei der Schwangerschaft Placentarteile in das Blut gelangen und dort abgebaut werden müssen. Entsprechend wird man auch Fermente gegen Krebseiweiß im Blut wohl erst dann erwarten dürfen, wenn Geschwulstteile durch das Blut verschleppt werden. Ganz ähnlich wird man auch erwarten können, daß die im normalen Blut auftretenden Fermente spezifisch sind; handelt es sich doch nur darum, Abbauprodukte aus einem ganz spezifischen „Körpereiweiß" weiter abzubauen. Wie oben wiederholt erwähnt wurde, können die Blutflüssigkeiten verschiedener Tiere verschiedene Polypeptide abbauen. Dies dürfte, wenn ich dem oben begonnenen Gedankengang folge, darauf

---

[1]) Abderhalden, Freund und Pincussohn, Serologische Untersuchungen mit Hilfe der optischen Methode während der Schwangerschaft, und speziell bei Eklampsie. Prakt. Ergebn. d. Geburtsh. u. Gynäkol. 2, 2. Abt., S. 367.

zurückzuführen sein, daß das normaliter im Organismus des betreffenden Tieres abzubauende Eiweiß eben solche Komplexe enthält, und umgekehrt wird die Blutflüssigkeit eines Tieres nur solche Eiweißprodukte abbauen können, die in seinem körpereigenen Eiweiß enthalten sind.

Um die hier ausgeführten Anschauungen zu verifizieren, habe ich in der gleichen Weise, wie Abderhalden angegeben hat, aus Muskeleiweiß Peptone dargestellt. Als Ausgangsmaterial für die hier zu schildernden Versuche diente Muskel von Hund und Katze. Die Muskulatur, hauptsächlich der Extremitäten gesunder, frisch getöteter Tiere, wurde mit der Fleischmaschine zerkleinert, so gut wie möglich blutfrei gewaschen, abgepreßt und in der Kälte mit der 5 fachen Menge 70%iger Schwefelsäure während 72 Stunden bei Zimmertemperatur digeriert. Nach dieser Zeit wurde durch ein Tuch filtriert, das stark verdünnte Filtrat mit Bariumhydrat genau neutralisiert, das Filtrat zur dünnen Sirupkonsistenz eingedampft und in eine sehr reichliche Menge Alkohol eingegossen. Im Eisschrank setzte sich das ausgefallene Pepton zu Boden, der Alkohol wurde abdekantiert, der Rückstand nochmals mit absolutem Alkohol verrührt; nachdem das Pepton im Eisschrank erhärtet war, wurde der Alkohol abgegossen und der Rückstand im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet. Es wurde so ein weißlichgelbes, stark hygroskopisches Produkt gewonnen. Es wurde auch versucht, die Peptondarstellung so zu modifizieren, daß die Einwirkung starker Schwefelsäure in der Kälte durch Kochen mit verdünnter 25%iger Schwefelsäure während 6 Stunden ersetzt wurde. Das Produkt entsprach jedoch nicht dem in der Kälte gewonnenen. Es wurden mehrere Präparate angefertigt: die hier geschilderten Versuche wurden ausgeführt mit 2 Peptonen aus Hundemuskel A, C (2 verschiedene Hunde) und einem Präparat aus Katzenmuskel; hierzu kommt das in der Wärme hergestellte Hundemuskelpepton B.

Gegen diese Peptone und vergleichsweise zum Teil gegen Seidenpepton prüfte ich das Blutserum von ungefähr 12 verschiedenen, als gesund befundenen Hunden. Die Versuchsanordnung war stets die gleiche. Hundeserum, 5%ige Peptonlösung und Kochsalzlösung mit Toluolzusatz wurden in der aus den Tabellen ersichtlichen Art gemischt, in den bekannten, mit

einem Wassermantel versehenen Polarisationsröhren von 50 bzw. 25 mm Länge in bestimmten Intervallen beobachtet und während der Zwischenzeit im Brutschrank bei 37° aufbewahrt. Der Polarisationsapparat von Schmidt und Haensch mit 3 teiligem Feld gestattete Ablesungen bis 0,01°; als Lichtquelle diente eine Nernstlampe: von dieser wurde, durch prismatische Zerlegung gewonnen, lediglich das Licht der Natriumlinie zur Beleuchtung angewandt.

Die nachstehenden Tabellen sind durchaus eindeutig. Alle untersuchten normalen Hundesera ohne Ausnahme waren imstande, die durch 70%ige Schwefelsäure aus Hundemuskel gewonnenen Peptone abzubauen. Eine Einwirkung auf das in der Wärme hergestellte Pepton war kaum vorhanden, was sich aus den veränderten Abbaubedingungen bei seiner Herstellung leicht erklärt. In keinem Falle aber war Hundeserum imstande, das ebenfalls durch 70%ige Schwefelsäure dargestellte Katzenpepton abzubauen. Es handelt sich also hier augenscheinlich um eine durchaus spezifische Wirkung, um ein spezifisches, anscheinend dem Hundeserum eigentümliches Ferment. Ich bin damit beschäftigt, diese Versuche auf andere Tierarten auszudehnen und zunächst einmal zu sehen, ob z. B. auch Katzenserum nur Katzenpepton abbauen kann, nicht aber Hundepepton. In Frage würde sodann kommen, nachzusehen, ob verwandte Tierarten identische Fermente besitzen, ob z. B. das Serum des Fuchses auch imstande ist, Hundemuskelpepton abzubauen. Die Immunitätserscheinungen geben uns ja bereits solche Gruppenreaktionen, und es wäre wohl möglich, daß wir auch auf diesem Wege zu ähnlichen Ergebnissen gelangten. Ich glaube, eine solche Fermentgemeinschaft würde uns die Artähnlichkeit viel näher bringen als die bis jetzt bekannten Reaktionen. Wenn das Ferment im Blute des einen Tieres auch das Pepton aus dem Gewebeeiweiß eines anderen Tieres spaltet, so werden wir berechtigt sein, auf einen gleichen Aufbau, zum mindesten auf das Vorhandensein gleicher Komplexe in dem Gewebeeiweiß dieser Tiere zu schließen, und es ergäbe sich die Folgerung, daß Artverwandtschaft zurückzuführen ist auf eine gleiche Zusammensetzung des Eiweißes der Gewebe.

Über weitere Fragestellungen, besonders in bezug auf Organspezifität, werde ich demnächst berichten.

Tabellen.

Tabelle I.

(Versuch 85, Hund 8.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundemuskelpeptonlsg.A, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 3,5 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,50	– 0,23
1	– 0,49	– 0,23
3	– 0,46	– 0,23
6	– 0,47	– 0,23
18	– 0,44	– 0,23
22	– 0,43	– 0,23
26	– 0,43	– 0,23
29	– 0,42	– 0,23

Tabelle II.

(Versuch 86, Hund 9.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlsg. A, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 3,5 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,51	– 0,23
5	– 0,49	– 0,23
13	– 0,46	– 0,23
15	– 0,48	– 0,23
19	– 0,47	– 0,23
26	– 0,44	– 0,23
30	– 0,42	– 0,23

Tabelle III.

(Versuch 87, Hund 4.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung A, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 4,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Seidenpeptonlösung, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,48	– 0,22	– 0,23
3	– 0,45	– 0,22	– 0,23
6	– 0,46	– 0,22	– 0,24
18	– 0,44	– 0,21	– 0,23
22	– 0,43	– 0,21	– 0,23
27	– 0,42	– 0,21	– 0,24

Tabelle IV.

(Versuch 101, Hund 5.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung A, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Seidenpeptonlösung, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 2,0 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	−0,34	−0,27	−0,22	−0,18
3	−0,34	−0,27	−0,22	−0,18
14	−0,32	−0,27	−0,22	−0,18
17	−0,30	−0,27	−0,21	−0,18
20	−0,32	−0,27	−0,22	−0,18
23	−0,30	−0,28	−0,22	−0,18
27	−0,28	−0,27	−0,22	−0,18

Tabelle V.

(Versuch 106, Hund 10.)

Stunden	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung A, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Seidenpeptonlsg. Roche, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 3,5 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	−0,65	−0,54	−0,42	−0,45
2	−0,64	−0,54	−0,42	−0,44
5	−0,62	−0,54	−0,42	−0,44
8	−0,60	−0,55	−0,42	−0,45
21	−0,58	−0,54	−0,42	
26	−0,57	−0,54	−0,42	−0,44

Tabelle VI.

(Versuch 107, Hund 11.)

Stunden	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung A, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 1,0 ccm Seidenpeptonlsg. Roche, 2,5 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 3,5 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	−0,54	−0,43	−0,32	−0,31
2	−0,52	−0,44	−0,32	−0,31
5	−0,51	−0,44	−0,32	−0,32
8	−0,49	−0,43	−0,33	−0,32
21	−0,46	−0,44		−0,32

Tabelle VII.

(Versuch 109, Hund 12.)

Stunden	1,0 ccm Serum, 0,5 ccm Hundepeptonlösung A, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 0,5 ccm Katzenpeptonlösung, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 0,5 ccm Seidenpeptonlsg. Roche, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	1,0 ccm Serum, 3,5 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,41	– 0,37	– 0,31	– 0,28
2	– 0,39	– 0,36	– 0,31	– 0,28
6	– 0,37	– 0,37	– 0,31	– 0,29
8	– 0,37	– 0,37	– 0,32	– 0,28
22	– 0,35	– 0,36	– 0,31	– 0,28
28	– 0,34	– 0,36		– 0,28

Tabelle VIII.

(Versuch 113, Hund 14.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung A, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung B, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 4,0 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,44	– 0,24	– 0,33	– 0,22
2	– 0,42	– 0,23	– 0,33	– 0,22
6	– 0,40	– 0,25	– 0,32	– 0,21
8	– 0,39	– 0,25	– 0,32	– 0,22
22	– 0,38	– 0,25	– 0,32	
26	– 0,37	– 0,26	– 0,32	

Tabelle IX.

(Versuch 116, Hund 15.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung B, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung C, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 3,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 4,0 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,25	– 0,58	– 0,35	– 0,22
3	– 0,24	– 0,54	– 0,35	– 0,21
5	– 0,22	– 0,53	– 0,35	– 0,22
20	– 0,25	– 0,50	– 0,34	– 0,22
24	– 0,23	– 0,52	– 0,35	– 0,22
28	– 0,24	– 0,49	– 0,34	– 0,22

Tabelle X.

(Versuch 117, Hund 16.)

Stunden	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung B, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Hundepeptonlösung C, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 1,0 ccm Katzenpeptonlösung, 1,0 ccm physiol. Kochsalzlösung	0,5 ccm Serum, 2,0 ccm physiol. Kochsalzlösung
0	– 0,16	– 0,43	– 0,27	– 0,15
3	– 0,15	– 0,39	– 0,27	– 0,15
5	– 0,14	– 0,40	– 0,26	– 0,15
20	– 0,15	– 0,36	– 0,27	– 0,14
24	– 0,14	– 0,37	– 0,26	– 0,14
28	– 0,14	– 0,36	– 0,26	– 0,14

Die Methylierung des Glykokolls mittels Formaldehyd.

Von

Walther Löb.

(Aus der chemischen Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 27. April 1913.)

Es ist bekannt, daß bei den synthetischen Vorgängen in der Pflanze der Eintritt der Methylgruppe eine bedeutsame Rolle spielt, die sich unter anderem in dem Auftreten einfacher methylierter Aminosäuren, wie z. B. des Betains, ausprägt. Aus der Konstitution solcher Verbindungen wie Sarkosin, Betain und ähnlicher, die jedenfalls synthetisch gebildet werden, auch wenn sie als faßbare Produkte in biologischen Vorgängen als Folgen von Abbaureaktionen auftreten, folgt, daß bereits in den ersten Phasen der Assimilationsprozesse die Natur über geeignete Mittel verfügen muß, die Methylgruppe zu erzeugen. Es ist klar, daß die bei solchen Synthesen verwandte Substanz gleichfalls ein einfaches Assimilationsprodukt sein und als eine der ersten Stufen des Aufbaus bereits erscheinen muß, wenn sie z. B. die Methylierung einer direkt aus Kohlensäure und Ammoniak erzeugten Aminosäure besorgen soll. Denn es handelt sich bei diesen Vorgängen um die Erzeugung der einfachen Bausteine komplizierter Moleküle, die als Endprodukte einer nach und nach verlaufenden Synthese erscheinen. Es dürfte also eine gewisse zeitliche Parallelität zwischen der Bildung der einfachen Aminosäuren und ihres Methylierungsmittels anzunehmen sein.

Durch meine bisherigen Untersuchungen über die chemische Wirkung der stillen Entladung konnte ich nun zwei künstliche Assimilationsvorgänge durchführen, die unter Benutzung der auch in der Natur angewandten Ausgangsprodukte und einer der strahlenden Energieform sehr nahestehenden Energie

zu den in der natürlichen Assimilation in erster Stelle auftretenden Stoffen führen: die Darstellung des Formaldehyds, Glykolaldehyds und Zuckers aus Kohlensäure und Wasser[1]) und die Darstellung einer einfachen Aminosäure, des Glykokolls[2]), aus Kohlensäure, Ammoniak und Wasser. Bleibt man bei dem Versuch, nach und nach die Naturprodukte aus den natürlichen Ausgangsstoffen darzustellen, einem Versuche, der über den wirklichen Gang der sich in natürlichen Prozessen abspielenden Vorgänge zu belehren verspricht, bei dem bisher experimentell erreichten, so ist unter den künstlich erhaltenen Assimilationsprodukten nur der Formaldehyd als eine Substanz anzusprechen, die unter Umständen die Fähigkeit der Methylierung besitzen kann. Diese Umstände bestehen darin, daß der Formaldehyd durch die Cannizarosche Reaktion Methylalkohol liefert, eine Reaktion, die wohl bei der Glykosid- und Esterbildung von Bedeutung ist, dann aber auch darin, daß der Formaldehyd in Gegenwart reduzierender Mittel, die bei natürlichen Prozessen stets vorhanden und wirksam sind, vielleicht ganz allgemein als Methylierungskörper zu fungieren vermag.

In der Literatur sind einige Fälle beschrieben, die eine solche Funktion des Formaldehyds als nicht unwahrscheinlich erscheinen lassen. Bereits vor 15 Jahren hatte ich beobachtet, daß p-Nitrotoluol in Gegenwart von Formaldehyd bei der elektrischen Reduktion in saurer Lösung in beträchtlicher Menge Dimethyltoluidin liefert[3]). Das Resultat des Versuches, der unternommen war, um durch Eingreifen des Formaldehyds die intermediär auftretende Hydroxylaminphase festzuhalten, ließ sich einfach so deuten, daß der Formaldehyd erst mit dem durch Reduktion entstandenen Toluidin reagiert, und daß das di- oder trimolekulare Kondensationsprodukt von Toluidin und Formaldehyd weiter zu Dimethyltoluidin unter gleichzeitiger Spaltung reduziert wird. Die elektrochemische Reduktionsfähigkeit der Kondensationsprodukte von sekundären Aminokörpern und Aldehyden ist dann später von Brand[4]), die des

[1]) Zeitschr. f. Elektrochem. 12, 282, 1906.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 46, 684, 1913.

[3]) Zeitschr. f. Elektrochem. 4, 428, 1898; 9, 470, 1903.

[4]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3460, 1909; vgl. auch D.R.P. Nr. 143197, 148054, 175071.

Hexamethylentetramins und anderer Ammoniakabkömmlinge des Formaldehyds und Acetaldehyds von Knudsen[1]) untersucht worden. Weiter ist die leichte Vereinigung der Aminogruppe mit Formaldehyd bekannt, so daß man bei dem Auftreten dieser beiden Molekülformen bei der natürlichen Assimilation zu der Annahme, daß sie miteinander in Reaktion treten, direkt gezwungen wird.

Aus diesen Gründen untersuchte ich zunächst die Frage, ob es gelingt, das Glykokoll durch Formaldehyd in einfacher Weise zu methylieren und es in Sarkosin, Dimethylglycin oder Betain überzuführen. Um diese Frage zu klären, muß man zuerst wissen, wie Formaldehyd ohne Mitwirkung reduzierender Agenzien mit Glykokoll reagiert. Bei der Literaturdurchsicht fand ich zu meiner Überraschung, daß diese Reaktion, auf die sich bekanntlich die vielfach angewandte Sörensensche Methode der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren gründet, überhaupt noch nicht beschrieben ist. Freilich ist der Ablauf der Reaktion für die Sörensensche Methode auch belanglos, wenn nur der Formaldehyd in irgendeiner Weise mit der Aminogruppe so reagiert, daß der saure Charakter der Carboxylgruppe in Erscheinung tritt. Und eine derartige Reaktion ist ja die einzig mögliche, so daß die Notwendigkeit, die Reaktion selbst aufzuklären, durch ihre quantitative Verwendung nicht direkt gegeben war.

Um über die Möglichkeiten der Reduktion der Formaldehydverbindungen des Glykokolls ein Bild zu gewinnen, mußten zunächst diese Verbindungen selbst dargestellt und ihre Eigenschaften geprüft werden. Da eine Reduktion in neutraler, saurer und alkalischer Lösung verfolgt werden sollte, wurden auch die Reaktionen zwischen Formaldehyd und Glykokoll in den gleichen Lösungsmitteln angestellt. Dabei zeigte sich, daß die Reaktion je nach der Art des Lösungsmittels verschieden verläuft. In neutraler Lösung verbindet sich 1 Mol Formaldehyd mit 1 Mol Glykokoll unter Wasseraustritt zu einer Anhydroformaldehydverbindung, die unter dem Einfluß von Säuren und Alkalien alsbald wieder in die Komponenten zerfällt. Läßt man die Reaktion jedoch in salzsaurer Lösung in der Wärme verlaufen, so entsteht aus 1 Mol Formaldehyd und 2 Mol Glyko-

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 42, 3994, 1909.

koll die recht beständige Methylenverbindung, das Methylendiglycin. In alkalischer Lösung schließlich bildet sich keine Verbindung, da das Anhydroformaldehydglycin (Methylenglycin) durch Alkalien gespalten wird und die Synthese des Methylendiglycins in alkalischer Lösung überhaupt nicht eintritt.

Um bei der Reduktion den vielleicht herrschenden natürlichen Verhältnissen nahe zu bleiben, wurden nicht die isolierten Formaldehydverbindungen des Glykokolls der Wirkung reduzierender Agenzien ausgesetzt, sondern nur untersucht, wie sich Glykokoll in Gegenwart stets zur Verfügung stehenden Formaldehyds, also in Gegenwart eines Überschusses des letzteren, bei der Reduktion verhält. Es zeigte sich nun, daß auf diese Weise in der Tat der Formaldehyd mit großer Leichtigkeit als Methylierungsmittel zu fungieren vermag. Es entstehen so unter geeigneten Bedingungen schnell und mit guten Ausbeuten Methylaminoessigsäuren.

Experimenteller Teil.

1. Die Einwirkung des Formaldehyds auf Glykokoll in neutraler Lösung.

Unterwirft man eine Lösung von 3 g Glykokoll in 25 ccm Wasser und 15 ccm einer Formaldehydlösung, die aus käuflicher 40%iger Lösung durch Destillation über Calciumcarbonat gewonnen war und einen Gehalt von ca. 35% Formaldehyd besaß, bei Siedetemperatur am Rückflußkühler der Reaktion, so hat sich nach $^1/_2$ Stunde die Lösung tiefgelb, nach 1 Stunde rot gefärbt. Nach $2^1/_2$stündiger Einwirkung wird der Formaldehyd durch Wasserdampf möglichst abgetrieben und der Destillationsrückstand auf dem Dampfbade zur Trockne gebracht. Es hinterbleibt ein gelbroter, zäher Sirup, der in Alkohol schwer löslich, in Wasser leicht löslich ist und auf keine Weise in krystallisierte Form gebracht werden konnte. Der Sirup, in Wasser gelöst und mit Blutkohle aufgehellt, reagiert sauer. Die Lösung gibt mit Nitroprussidnatrium, Phenylhydrazin und Alkali in der Kälte nicht direkt eine Reaktion auf freien Formaldehyd, wohl aber, wenn die Lösung vorher mit Alkalien oder Säuren zusammengebracht war. Es handelt sich also um eine leicht spaltbare Verbindung, so daß in dem Apparate von van Slyke freier Aminosäurestickstoff

abgespalten wird, wie aus dem Glykokoll selbst. Die mit Calciumcarbonat in der Kälte neutralisierte Lösung des Sirups gibt die Ninhydrinreaktion[1]). Die Sörensensche Formoltitration weist auf die Gegenwart von freiem Glykokoll hin. Obgleich es nicht gelang, die Substanz zu reinigen, so ließ sich doch aus der Lösung des Sirups durch Ermittelung des Methylenglykokollgehalts nach Sörensen und der Formaldehydbestimmung in aliquoten Teilen feststellen, daß 1 Mol Glykokoll mit 1 Mol Formaldehyd in Reaktion getreten war. Es entsteht mithin in neutraler Lösung das Methylenglykokoll:

$$CH_2 = N.CH_2.COOH.$$

20 ccm der auf 200 ccm gebrachten Lösung des Sirups (aus 2 g Glykokoll), die durch Kochen mit Tierkohle entfärbt war, wurden zur Bestimmung der sauer reagierenden Methylenverbindung direkt gegen $^n/_{10}$-NaOH titriert (Phenolphthalein als Indicator); dann ließ sich nach Zugabe einer neutralen Formaldehydlösung aus der erneut auftretenden Acidität das freie Glykokoll und in weiteren 20 ccm nach der Jodmethode der Formaldehydgehalt ermitteln. Es wurde so für 200 ccm der Lösung gefunden:

Methylenverbindung . . 0,4650 g,
Freies Glykokoll . . . . 0,5712 g,
Formaldehyd . . . . . 0,1470 g,

während der für die Methylenverbindung berechnete Formaldehyd 0,1410 g beträgt.

In diesem Falle war, um den überschüssigen Formaldehyd mit Sicherheit zu entfernen, mehrere Stunden Dampf durch die Lösung geleitet worden, wobei eine weitgehende Spaltung eintrat, die sich wahrscheinlich bis zur vollständigen Regeneration des Glykokolls hätte fortsetzen lassen.

Die leichte Spaltbarkeit der Verbindung läßt sich auch dadurch nachweisen, daß man die schwach alkalische Lösung in gewöhnlicher Weise mit β-Naphthalinsulfochlorid behandelt. Es entsteht dabei glatt Naphthalinsulfoglycin, das nach ein-

---

[1]) Die genauen Angaben über das Verhalten des Triketohydrindenhydrats (Ninhydrin) gegenüber Aminosäuren siehe bei Ruhemann: Journ. of chem. Soc. **97**, 1438, 2030, 1910; **99**, 798, 1911; vgl. auch Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. **72**, 37, 1911.

maligem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol bei 156 bis 158° schmolz und den verlangten Stickstoffgehalt besaß. 0,1836 g Substanz nach Kjeldahl verascht, verbrauchten 7,1 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4:

Gefunden . . . . . . 5,41 $^0/_0$ N,
Berechnet . . . . . . 5,28 $^0/_0$ N.

Aus dem Verhalten dieser leicht zersetzlichen Verbindung schien hervorzugehen, daß sie sich nicht zur weiteren Reaktion eignet. Um so bemerkenswerter ist es, daß in Gegenwart von Zinkstaub in neutraler Lösung trotzdem eine Reaktion eintritt, die zu methylierten Aminosäuren führt. Jedoch verläuft sie kompliziert; ihrer Aufklärung soll eine spätere Mitteilung dienen.

2. Die Einwirkung des Formaldehyds auf Glykokoll in alkalischer Lösung.

Es gelingt nicht, die beiden Komponenten in alkalischer Lösung zur Reaktion zu bringen. Die Entstehung des Methylenglykokolls wird durch das Alkali verhindert, so daß lediglich unverändertes Glykokoll wiedergefunden wird, auch wenn die Flüssigkeiten stundenlang am Rückflußkühler gekocht haben. Wurden 2 g Glykokoll mit 8 ccm Formaldehyd und 160 ccm $^{n}/_{1}$-Natronlauge 5 Stunden am Rückflußkühler erhitzt, so hat sich die Lösung (schon nach kurzer Zeit) rot gefärbt. Sie enthält keinen Formaldehyd mehr, wohl aber Ameisensäure und Methylalkohol und die weiteren Reaktionsprodukte des Formaldehyds mit Natronlauge. Außerdem ließ sich nur unverändertes Glykokoll nachweisen, dessen salzsaures Salz sich aus der mit Salzsäure eingedampften Flüssigkeit durch 90 $^0/_0$igen Alkohol extrahieren und auf umständlichen Wege unter großen Verlusten reinigen läßt. Daß Glykokoll in der Lösung unverändert vorhanden ist, ließ sich durch die Stickstoffbestimmung nach van Slyke und die Sörensensche Titration ermitteln.

Mit Naphthalinsulfochlorid gibt die Reaktionslösung sofort Naphthalinsulfoglycin.

Versucht man mit Zink in alkalischer Lösung zu reduzieren, so resultiert gleichfalls nur unverändertes Glykokoll, das nach Entfernung des Zinks durch Schwefelwasserstoff aus schwach essigsaurer Lösung ebenso nachgewiesen wurde, wie in dem oben beschriebenen Versuche.

3. Die Einwirkung des Formaldehyds auf Glykokoll in saurer Lösung.

Ganz anders verläuft die Reaktion in Gegenwart von Salzsäure. Kocht man ein Gemisch von 3 g Glykokoll, 25 ccm Salzsäure (25 %) und 15 ccm 40 % iger Formaldehydlösung 5 Stunden am Rückflußkühler, treibt den Formaldehyd mit Wasserdampf ab, so hinterbleibt beim Trocknen des Destillationsrückstandes auf dem Dampfbad ein gelber Sirup, der nach mehrstündigem Stehen langstrahlig krystallinisch erstarrt. Sein Gewicht ist nach dem Trocknen auf Ton 3 g. Im Gegensatz zum salzsauren Glykokoll ist dieses salzsaure Salz in absolutem Alkohol in der Wärme leicht löslich, kann aber aus wenig Alkohol in klaren, rhombischen Krystallen vom Schmelzpunkt 165° gewonnen werden. Den gleichen Schmelzpunkt besitzt die durch Äther erzielbare Fällung der Mutterlauge. Zur Analyse wurde das nochmals krystallisierte Salz bei 100° getrocknet. Die Verbindung zeigt nach dem Neutralisieren der wässerigen Lösung mit Calciumcarbonat die Ninhydrinreaktion blaurot, gibt aber im Apparat von van Slyke keinen Aminosäurenstickstoff. Zur Analyse wurde ein Teil des Salzes in Wasser gelöst, die Salzsäure durch Titration gegen Silbernitrat unter Zusatz eines Überschusses von Natriumacetat bestimmt und der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl ermittelt. 0,5408 g des salzsauren Salzes wurden in 50 ccm Wasser gelöst, 10 ccm zur Chlorbestimmung und 20 ccm zur Stickstoffbestimmung, 10 ccm zur Aminosäurenstickstoffbestimmung nach van Slyke angewandt.

1. Cl-Bestimmung: 9,1 ccm $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$ = 0,03226 g = 29,82 % Cl.
2. N-Bestimmung: 17,6 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4 = 0,02462 g = 11,40 % N.
3. Slyke-Bestimmung: 0,2 ccm N: —

Berechnet für $C_5H_{12}N_2O_4Cl_2$: Cl = 30,18 %, N = 11,9 %.

Es liegt mithin das Dichlorhydrat des Methylendiglykokolls

$$\underset{}{HOOC.CH_2.}\underset{HCl}{NH}-CH_2-\underset{HCl}{NH}.CH_2.COOH$$

vor, das im Gegensatz zu dem Methylenglykokoll eine recht beständige Verbindung ist, die weder durch verdünnte Säuren, noch durch verdünnte Alkalien gespalten wird.

Um aus dem salzsauren Salz die freie Verbindung zu gewinnen, schüttelt man die wässerige Lösung des Chlorhydrates

mit einem Überschuß von feuchtem Silberoxyd, wobei ein in Wasser leicht lösliches Silbersalz des Methylendiglykokolls entsteht, das beim Kochen zersetzt wird. Es wird deshalb die kalte Lösung des Silbersalzes sofort mit Schwefelwasserstoff behandelt, wobei das Schwefelsilber meist kolloidal gelöst bleibt. Man verjagt dann ohne Filtration den Schwefelwasserstoff durch einen Luftstrom, bringt zur Trockne und extrahiert mit absolutem Alkohol. Man erhält so nach dem Filtrieren von dem nunmehr unlöslich gewordenen Schwefelsilber eine wasserklare Lösung, aus der nach dem Einengen die freie Verbindung in kleinen Krystallplättchen krystallisiert, die unscharf gegen 199° unter Aufschäumen schmelzen. Im Gegensatz zu den Methylaminoessigsäuren ist die Verbindung nicht hygroskopisch. Von einer Analyse der freien Verbindung wurde Abstand genommen.

Das Vorhandensein der beiden Imidogruppen befähigt die Verbindung noch zur Reaktion mit Naphthalinsulfochlorid. Es entsteht das Methylendinaphthalinsulfodiglycin, das sich aus ganz verdünntem Alkohol mikrokrystallinisch abscheidet und bei 169 bis 170° schmilzt. Die analytischen Daten sind die folgenden: 0,5034 g Substanz, nach Kjeldahl verbrannt, gaben einen Verbrauch von 18,0 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4 = 0,0252 g N.

Berechnet für Dinaphthalinsulfomethylendiglycin: N : 5,17 %
Gefunden: 5,06 %.

4. Die Einwirkung von Zinn auf Formaldehyd und Glykokoll in saurer Lösung.

Kocht man 4 g Glykokoll, 15 ccm 40 % ige Formaldehydlösung, 25 ccm Salzsäure (25 %) mit 10 g Zinnschnitzeln 3 Stunden am Rückflußkühler, so ist der größte Teil des Zinns gelöst, ohne daß die Farbe der Lösung sich ändert. Nach dem Abgießen vom unangegriffenen Zinn wird mit Wasser verdünnt und die Lösung durch einen Dampfstrom vollständig vom Formaldehyd befreit. Das ist notwendig, um bei dem folgenden Entzinnen mit Schwefelwasserstoff die Bildung von Trithiomethylen zu vermeiden, die die Bearbeitung der Reaktionsprodukte erschwert. Nach dem Ausfällen des Zinns und Filtration muß zunächst der überschüssige Schwefelwasserstoff bei gewöhnlicher Temperatur durch einen Luftstrom vollständig entfernt werden, damit bei dem folgenden Eindampfen der

wasserklaren Lösung auf dem Dampfbade Verunreinigung durch schwefelhaltige Verbindungen vermieden wird. Der alsbald krystallinisch erstarrende Rückstand ist schneeweiß, sein Rohgewicht 5,2 g. Die Substanz löst sich leicht in absolutem Alkohol; aus der konzentrierten Lösung scheidet sie sich in derber Krystallisation ab; der Rest kann aus der Mutterlauge durch Äther gefällt werden. Beide Fraktionen schmelzen unscharf bei 174 bis 181° und bestehen aus einem Gemisch von Sarkosin — Schmelzpunkt des salzsauren Salzes des Sarkosins 168 bis 170° — und Dimethylaminoessigsäure.

Daß ein solches Gemisch vorlag, ergab sich sowohl aus dem unscharfen Schmelzpunkt wie aus den Analysen. Zur Ausführung derselben wurden z. B. 1,1778 g in 100 ccm Wasser gelöst und 20 ccm zur Stickstoffbestimmung, 10 ccm zur Chlorbestimmung, 10 ccm zur Aminosäurestickstoffbestimmung nach van Slyke benutzt. Es wurden so gefunden: 11,05 % Stickstoff, 25,6 % Chlor, während bei einer andern Analyse 10,7 % Stickstoff und 27,33 % Chlor ermittelt wurden. Sarkosinchlorhydrat verlangt 28,26 % Chlor und 11,15 % Stickstoff; das salzsaure Salz der Dimethylaminoessigsäure enthält 25,39 % Chlor und 10,05 % Stickstoff. Im Apparat von van Slyke wurde kein Aminosäurenstickstoff abgespalten.

Die Trennung der beiden Methylaminoessigsäuren ließ sich auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse nicht durchführen. Auch die aus den Chlorhydraten durch feuchtes Silberoxyd nach Entfernung des gelösten Silbers durch Schwefelwasserstoff gewinnbaren freien Säuren eignen sich wegen ihrer hygroskopischen Natur nicht zu Trennungsversuchen. Der Nachweis, daß die beiden genannten Methylaminoessigsäuren vorlagen, ließ sich auf Grund der Tatsache führen, daß das Sarkosin mit Naphthalinsulfochlorid ein wohl charakterisiertes Derivat liefert, während die Dimethylaminoessigsäure mit Naphthalinsulfochlorid nicht mehr in Umsetzung treten kann.

Es wurde in folgender Weise verfahren: 2 g des salzsauren Reaktionsproduktes wurden mit 16 ccm n-Natronlauge neutralisiert und die gleiche Menge Natronlauge nebst 20 ccm Wasser zugesetzt. Diese Lösung wurde mit 4 g Naphthalinsulfochlorid in 20 ccm Äther 4 Stunden geschüttelt, dann nochmals 16 ccm n-Natronlauge hinzugegeben und weitere 2 Stunden geschüttelt.

Mittels der gewöhnlichen Bearbeitung wurden etwa 1,5 g Naphthalinsulfoverbindung durch Säuren gefällt, die nach dem Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol bei 171 bis 172° schmolz. Friedmann[1]) gibt für den Schmelzpunkt des Naphthalinsulfosarkosins 172 bis 173° an. Die Analyse bestätigte, daß in der Tat dieser Körper vorlag: 0,3591 g nach Kjeldahl verascht, verbrauchten 12,8 ccm $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure = 0,0179 g Stickstoff. Das sind 4,99 %, während das Sarkosinderivat 5,02 % verlangt.

Um aus dem Filtrat des Naphthalinsulfosarkosins die Dimethylaminoessigsäure zu gewinnen, wurde dasselbe nach dem Ausäthern auf dem Wasserbade eingedampft, wobei sich Kristalle von Naphthalinsulfosäure ausscheiden. Der möglichst scharf getrocknete Rückstand wird zur Entfernung des Kochsalzes mit absolutem Alkohol extrahiert und der Extraktionsrückstand nochmals mit absolutem Alkohol behandelt. Die nach dem Abdampfen des Alkohols bleibende Krystallmasse, die noch etwas Naphthalinsulfosäure enthält, wurde in wässeriger Lösung mit feuchtem Silberoxyd geschüttelt, wobei unter Abscheidung von Chlorsilber das lösliche Silbersalz der Dimethylaminoessigsäure und das unlösliche Silbersalz der Naphthalinsulfosäure entsteht. Bei dieser Reaktion, die wegen der Zersetzlichkeit des dimethylaminoessigsauren Silbers in der Kälte vorgenommen werden muß, tritt alkalische Reaktion auf. In dem Filtrate von den Silberverbindungen wurde das reichlich gelöste Silber nunmehr mit Salzsäure gefällt, vom Chlorsilber abfiltriert und die salzsaure Lösung auf dem Dampfbade zur Trockne gebracht. Es resultierten so etwa 0,3 g salzsaures Salz, das aus wenig absolutem Alkohol krystallisiert werden konnte und nunmehr bei 183 bis 184° schmolz. Die Analyse bestätigte, daß reine Dimethylaminoessigsäure vorlag: 0,2146 g wurden in 50 ccm Wasser gelöst und je 20 ccm zur Stickstoff- und Chlorbestimmung verwandt. Für diese wurde gefunden: 0,02159 g Chlor und 0,00868 g Stickstoff.

Berechnet für $HCl(CH_3)_2NCH_2COOH$: Cl: 25,39 %, N: 10,05 %
Gefunden: Cl: 25,15 %, N: 10,11 %

Aus dem Silbersalz ließ sich durch Schwefelwasserstoff die freie Verbindung gewinnen, die beim Verdunsten ihrer wässe-

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **11**, 158, 1908.

rigen Lösung im Vakuum in rosettenförmig angeordneten Blättchen krystallisiert und sehr hygroskopisch ist. Das Kupfersalz ist blau gefärbt und in Wasser und Alkohol sehr leicht löslich.

Setzt man das Kochen am Rückflußkühler unter Verwendung von 3 g Glykokoll, 40 ccm Salzsäure, 15 ccm Formaldehyd und 5 g Zinn 8 Stunden fort, so ist alles Zinn verschwunden, aber es tritt bei diesem langen Kochen eine geringfügige Zersetzung ein, die veranlaßt, daß dem Reaktionsgemisch etwa 10% Glykokoll beigemischt sind. Die Gegenwart des Glykokolls läßt sich durch die Sörensensche Titration und die van Slykesche Stickstoffabspaltung feststellen. Weder Sarkosin, noch Dimethylglycin lassen sich durch die genannten Reaktionen erkennen. Auch bei dem so lange durchgeführten Versuch ließen sich Sarkosin und Dimethylglycin in der geschilderten Weise isolieren. Die geringe Menge des dem Naphthalinsulfosarkosin beigemengten Naphthalinsulfoglycins kann durch einmaliges Umkrystallisieren aus verdünntem Alkohol entfernt werden. Das erstere zeigte sofort den richtigen Schmelzpunkt und krystallisierte in zu Drusen vereinten Nadeln, ähnlich dem Naphthalinsulfoglycin.

Theoretisches.

Die Beobachtung, daß in salzsaurer Lösung der Formaldehyd mit dem Glykokoll zu Methylendiglycin zusammentritt, während das Methylenglycin unter diesen Bedingungen nicht existieren kann, ermöglicht zusammen mit der Tatsache, daß Sarkosin und Dimethylglycin bei der Reaktion gleichzeitig entstehen, eine Klarlegung des Reaktionsganges. Das zunächst entstehende Methylendiglycin wird reduziert unter gleichzeitiger Spaltung und bildet 1 Mol Sarkosin und 1 Mol Glykokoll. Beide Verbindungen unterliegen weiter der Einwirkung des überschüssigen Formaldehyds. Das Glykokoll geht wieder in Methylendiglycin über und schließt sich dem eben erwähnten Reaktionsgang an. Das Sarkosin wird durch den Formaldehyd in Methylendisarkosin verwandelt, dessen Reduktion unter gleichzeitiger Spaltung 1 Mol Dimethylaminoessigsäure und 1 Mol Sarkosin liefert. Letzteres fällt dann, soweit noch Formaldehyd zugegen ist, der erneuten Reaktion mit diesem und der ihr folgenden Reduktion und Spaltung anheim. Bei Abbruch des

Versuchs resultiert so ein Gemisch von Sarkosin und Dimethylglycin. Hat bei zu langem Kochen der Formaldehydgehalt sehr stark abgenommen oder ist der Formaldehyd ganz aus der Lösung herausgekocht, so scheint es, daß geringe Mengen des Methylendiglycins durch die Salzsäure wieder gespalten werden, bevor die Reduktion die gegen Salzsäure beständigeren Methylaminoessigsäuren geschaffen hat. Die Reaktionsfolge wird durch die Gleichungen veranschaulicht:

$$\text{I. } 2NH_2CH_2COOH + CH_2O = CH_2\begin{matrix} \diagup NHCH_2COOH \\ \diagdown NHCH_2COOH \end{matrix} + H_2O$$

$$\text{II. } CH_2\begin{matrix} \diagup NHCH_2COOH \\ \diagdown NHCH_2COOH \end{matrix} + H_2 = (CH_3)NHCH_2COOH + NH_2CH_2COOH$$

$$\text{III. } 2(CH_3)NHCH_2COOH + 2NH_2CH_2COOH + 2CH_2O$$
$$= CH_2\begin{matrix} \diagup N(CH_3)CH_2COOH \\ \diagdown N(CH_3)CH_2COOH \end{matrix} + CH_2\begin{matrix} \diagup NHCH_2COOH \\ \diagdown NHCH_2COOH \end{matrix} + 2H_2O$$

$$\text{IV. } CH_2\begin{matrix} \diagup N(CH_3)CH_2COOH \\ \diagdown N(CH_3)CH_2COOH \end{matrix} + H_2 = (CH_3)_2NCH_2COOH + (CH_3)HNCH_2COOH$$

Zusammenfassend läßt sich aus den geschilderten Versuchen der Schluß ziehen, daß der Formaldehyd unter geeigneten reduzierenden Bedingungen leicht das Glykokoll zu methylieren vermag, so daß die Ansicht, der Formaldehyd wirke auch in natürlichen Vorgängen als Methylierungsmittel, eine experimentelle Stütze erhält. Daß diese Methylierung sich auch in neutraler Lösung durch Reduktion erreichen läßt, habe ich bereits erwähnt. Der Aufklärung dieser Reaktion müssen aber noch weitere Untersuchungen dienen.

Über zuckerfreie Hefegärungen. XI.

Weiteres zur Kenntnis der Carboxylase.

Von

C. Neuberg und P. Rosenthal.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

Durch den Vorgang der zuckerfreien Gärung erzeugt das Ferment Carboxylase aus Brenztraubensäure Kohlendioxyd und Acetaldehyd. Das Ausgangsmaterial wie die Reaktionsprodukte stehen in den wiederholt von uns erörterten Beziehungen zum Prozeß der alkoholischen Gärung. Um einen weiteren Einblick in diesen Zusammenhang zu gewinnen, haben Neuberg und Kerb[1]) versucht, die Vergärung der Brenztraubensäure so zu leiten, daß an Stelle des Acetaldehyds Äthylalkohol auftritt. Durch die Wiederholung der Laboratoriumsversuche im Großen, über die ausführlich an anderer Stelle berichtet werden wird, haben diese Alkoholbefunde volle Bestätigung erhalten. Es ist jetzt unzweifelhaft, daß aus Brenztraubensäure durch einen Gärakt Äthylalkohol hervorgehen kann. Damit ist ein neues und bedeutsames Argument zugunsten der Auffassung gewonnen, daß die Brenztraubensäure ein intermediäres Produkt des Zuckerabbaues bilden dürfte.

Dieser Ansicht, die für den Kohlenhydratumsatz der Hefe von Neuberg mit Hildesheimer, Karczag und Kerb, für den Zuckerumsatz des Tieres in anschließenden Arbeiten von P. Mayer und Tschernorutzki entwickelt worden ist, sind

---

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie 1, 114, 1912.

bereits andere Autoren, wie v. Lebedew, Kostytschew, Zaleski und Embden beigetreten.

Die weitere Entwicklung dieser Gedankengänge erheischt es nun, über die Stellung der Carboxylase im System der zuckerabbauenden Fermente Klarheit zu schaffen.

A. Unterschiede in der Wirkung von Carboxylase und Zymase bei Gegenwart antiseptischer Mittel.

Über die Beziehung der Carboxylase zur Zymase haben Neuberg und Karczag[1]) vor 2 Jahren folgendes ermittelt: Brenztraubensaure Salze werden durch frische Hefen bei Gegenwart von Antisepticis (Chloroform) vergoren. Unter solchen Bedingungen werden bekanntlich Traubenzucker oder Saccharose nicht zerlegt. Damit war schon der erste scharfe Unterschied zwischen Carboxylase und Zymase gefunden.

Wir haben diese Versuche, die damals mit untergärigen Hefen angestellt waren, mehrfach wiederholt und auf andere Heferassen[2]) ausgedehnt. Es ergab sich, daß der erwähnte Unterschied zwischen Carboxylase und Zymase bei Gegenwart von Chloroform stets deutlich zutage tritt (Tabelle a und b), während Toluol für diesen Zweck viel unsicherer wirkt (Tabelle c und d). Denn verschiedene Hefen, namentlich obergärige, fanden wir befähigt, Zucker auch in Gegenwart von Toluol zu vergären, wenngleich in vermindertem Umfange. Daß Toluol manchmal die Gärung vollständig unterdrückt, bisweilen nicht, dürfte mit dem wechselnden Ernährungszustand und Enzymgehalt der frischen Hefen in Zusammenhang zu bringen sein.

I. Weitere vergleichende Versuche über die Gärung von Traubenzucker und brenztraubensaurem Kalium mit frischen Hefen in Gegenwart von Antisepticis.

Diese Versuche (Serie a und c) sind in der Weise angestellt, daß je 15 ccm einer 1,6 $^0/_0$igen Lösung von Traubenzucker und

---

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 76, 1911.

[2]) Wir verdanken fast alle in dieser Mitteilung angeführten Hefen wiederum dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin.

ins Kaliumsalz verwandelte Brenztraubensäure[1]) mit 2 g der betreffenden Hefe und 0,4 ccm des gewählten Antisepticums in einem Reagensglase emulsioniert wurden. Die gleichmäßige Suspension wurde dann sofort in Gärröhrchen überführt.

In Serie b und d kamen 1 °/₀ige Lösungen von Traubenzucker und ins Kaliumsalz verwandelter Brenztraubensäure[1]) zur Verwendung.

Von den benützten Hefen waren M und XII obergärig, K untergärig.

Chloroformversuche.

a)

Heferasse	CO_2 aus 1,6°/₀iger Glucoselösung nach		CO_2 aus 1,6°/₀iger Lösung von brenztraubensaur. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit $CHCl_3$-Wasser nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
M	0	0	Spur	4,0	0	0
XII	0	0	1	2,5	0	0
K	0	Spur	2	8,0	0	0

b)

Heferasse	CO_2 aus 1°/₀iger Glucoselösung nach		CO_2 aus 1°/₀iger Lösung von brenztraubensaur. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit $CHCl_3$-Wasser nach	
	16 Std. ccm	24 Std. ccm	16 Std. ccm	24 Std. ccm	16 Std. ccm	24 Std. ccm
M	0	0	4	4,0	0	0
XII	0	0	4	4,5	0	Spur

[1]) Als Ausgangsmaterial diente für die in dieser Mitteilung beschriebenen Versuche eine $^2/_{10}$ n-Brenztraubensäure. 100 ccm derselben enthalten 1,76 g Brenztraubensäure; durch Neutralisation mit 10 ccm 2 n-KOH werden 110 ccm Flüssigkeit gewonnen, die in bezug auf Brenztraubensäure 1,6°/₀ig ist. Durch entsprechende Verdünnung bzw. durch Zusatz der „Puffer“ (s. S. 132) sind alle verwendeten Lösungen gewonnen. Der Kürze wegen werden die Lösungen des Kaliumsalzes, die eigentlich in bezug auf Brenztraubensäure 1°/₀ig bzw. 1,6°/₀ig sind, als 1°/₀ige bzw. 1,6°/₀ige Kaliumsalzlösungen bezeichnet. Denn für den Vergleich schien es uns zweckmäßiger, die Zahlenangaben auf die Säure selbst zu normieren.

Toluolversuche.

c)

Heferasse	CO_2 aus 1,6%iger Glucoselösung nach		CO_2 aus 1,6%iger Lösung von brenztraubensaur. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit Toluolwasser nach	
	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm	5 Std. ccm	20 Std. ccm
M	4	7	8,0	11	0	0
XII	2	3	2,5	6	0	0
K	Spur	2	6,0	7	0	0

d)

Heferasse	CO_2 aus 1%iger Glucoselösung nach		CO_2 aus 1%iger Lösung von brenztraubensaur. Kalium nach		CO_2 aus Hefe allein mit Toluolwasser nach	
	16 Std. ccm	24 Std. ccm	16 Std. ccm	24 Std. ccm	16 Std. ccm	24 Std. ccm
M	4,0	4	8	8,5	0	0
XII	2,5	3	5	5,5	0	0

Zu den Tabellen[1]) ist noch folgendes zu bemerken:

Die Gesamtkapazität der Gärröhrchen betrug 11 ccm. Die Versuche der letzten Kolumne sind einfach Kontrollen auf Selbstgärung der benützten Menge Hefe, die mit der entsprechenden Quantität Antisepticum in 15 ccm Leitungswasser suspendiert war.

Die Chloroformversuche zeigen klar, daß brenztraubensaures Kalium unter Bedingungen vergoren wird, wo Glucose nicht angegriffen wird.

Die Toluolversuche lassen immerhin eine stärkere Vergärung des brenztraubensauren Salzes erkennen im Vergleich mit der Vergärung des Traubenzuckers, die unter denselben Umständen eingeschränkt ist.

[1]) Hier wie im folgenden wird das Gärungsergebnis mit 0 bezeichnet, wenn die Gasansammlung weniger als 0,25 ccm (Luftblase) betrug, mit Spur, wenn die Quantität geringer als 0,5 ccm war.

II. Vergleichende Versuche über die Gärung von Traubenzucker und „gepufferter“ Brenztraubensäure mit frischen Hefen in Gegenwart von Antisepticis.

Neuberg und Karczag haben (l. c.) weiter angegeben, daß bei Gegenwart von Chloroform, im Gegensatz zu Zucker, nur brenztraubensaure Salze vergoren werden, nicht aber freie Brenztraubensäure. Da nun lebende Hefe sowie Hefemacerationssaft auch freie Brenztraubensäure zerlegen, so haben schon Neuberg und Karczag darauf hingewiesen, daß Änderungen der physikalisch-chemischen Zustände in den Hefezellen dieses unterschiedliche Verhalten bedingen können. In erster Linie muß man daran denken, daß unter dem Einflusse der stark sauren Brenztraubensäure Protoplasmaproteine ausgeflockt werden und so eine erhebliche Milieuverschiebung bedingen, vielleicht auch Carboxylase mechanisch einhüllen.

War diese Auffassung richtig, so mußte es gelingen, durch Abschwächung der Gerinnungsvorgänge auch freie Brenztraubensäure durch frische Hefe in Gegenwart von Chloroform zur Vergärung zu bringen. Dieses Ziel konnten wir durch Benutzung des bekannten Pufferprinzips von Soerensen erreichen, und zwar durch Anwendung von Phosphaten, Arseniten und Boraten. Die beiden letztgenannten Agenzien haben sich am besten bewährt. Die Lösungen von brenztraubensauren Alkalien, denen durch arsenige Säure oder Borsäure schwache Acidität verliehen ist, geraten auch bei Gegenwart von Chloroform mit frischer Hefe in Gärung. (Tabelle f und g.)

Da jedoch bisher über die Gärfähigkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von Borat- oder Arsenitionen nichts ermittelt worden war, so haben wir dieselbe zunächst an den Gemischen ohne Zusatz von Chloroform bzw. Toluol geprüft (Tabelle e).

Die Puffersysteme können in doppelter Weise bereitet werden. Entweder versetzt man die Lösung von brenztraubensaurem Alkali mit fester Borsäure bzw. arseniger Säure oder fügt zu der Lösung von freier Brenztraubensäure die entsprechende Menge Borat oder Arsenit.

Die Boratgemische haben wir meist auf dem ersten Wege, die Arsenitgemische auf dem zweiten hergestellt. Die Reaktion haben wir gerade schwach sauer gegen Lackmus gewählt.

Gärfähigkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von Natriumarsenit und Kaliumborat.

e)

Hefe-rasse	CO_2 aus 1,6%iger Lösung von Brenztraubensäure in Gegenwart von				CO_2 allein[1]) aus Hefe in Gegenwart von			
	Na-Arsenit nach		K-Borat nach		Na-Arsenit nach		K-Borat nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
M	5	7	6	11	0	Spur	0	0
XII	3	8,5	5	6	0	Spur	0	0
K	11	11,0	4	5	0	0	0	0

Gärfähigkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von Puffern und Chloroform.

f)

Hefe-rasse	CO_2 aus 1,6%iger Lösung von Brenztraubensäure in Gegenwart von Chloroform und				CO_2 allein aus Hefe in Gegenwart von Chloroform und			
	Na-Arsenit nach		K-Borat nach		Na-Arsenit nach		K-Borat nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
M	4	5,5	5,0	11,0	0	0	0	0
XII	0	0	4,5	5,0	0	0	0	Spur
K	0	2	1,5	5,5	0	0	0	0

Gärfähigkeit von Brenztraubensäure in Gegenwart von Puffern und Toluol.

g)

Hefe-rasse	CO_2 aus 1,6%iger Lösung von Brenztraubensäure in Gegenwart von Toluol und				CO_2 allein aus Hefe in Gegenwart von Toluol und			
	Na-Arsenit nach		K-Borat nach		Na-Arsenit nach		K-Borat nach	
	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.	5 Std.	20 Std.
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
M	0	0	7,0	11,0	0	0	0	0
XII	0	0	6,5	6,5	0	0	0	0
K	0	Spur	4,0	6,0	0	0	0	Spur

[1]) In Gegenwart von Salzen ist die Selbstgärung bei obiger Versuchsanordnung fast durchweg Null, während sie ohne Salzanwesenheit merklich sein kann. Diese Beobachtung haben wir mit den benutzten Heferassen wiederholt machen können. (Diese Zeitschr. 36, 67 u. 80, 1911.)

Die Versuche der Tabellen e, f und g sind mit denen der Tabellen a und c gleichzeitig angestellt und also direkt vergleichbar. Die Arsenitzugaben wirkten unregelmäßig. Ohne gleichzeitige Anwesenheit organischer Antiseptica können sie einen förderlichen Einfluß ausüben, während die vereinte Wirkung von Arsenit und Chloroform, bzw. Toluol offenbar die Reaktion stark beeinträchtigt.

Auch auf die zellfreie Vergärung des Rohrzuckers hat das Arsenit eine unregelmäßige Wirkung. E. Buchner[1]) hat es hier zu ganz anderen Zwecken, als Antisepticum, benutzt und des öfteren eine Hemmung, ja völlige Aufhebung des Gäraktes durch Kaliumarsenit beobachtet.

Dagegen zeigt sich, daß Boratzusatz ungefähr die gleichen Resultate liefert, wie man sie mit dem Kalisalz ohne Pufferzugabe erhält.

Damit ist der früher von uns geführte wichtige Beweis vervollständigt, daß Carboxylase Brenztraubensäure unter Bedingungen vergärt, unter denen Zymase Zucker nicht mehr zerlegt.

III. Vergleichende Versuche über die Gärung von Traubenzucker und „gepufferter“ Brenztraubensäure mit Trockenhefen in Gegenwart von Chloroform.

Die von der Zelle getrennten Gärungsagenzien, Buchnerscher Preßsaft oder v. Lebedewscher Macerationssaft, sind bekanntlich in ihrer Wirksamkeit weitgehend unabhängig von zugefügten Antisepticis. Es war nun von Wichtigkeit, die Trockenhefen in ihrer Wirksamkeit auf Brenztraubensäure und Zucker zu vergleichen; denn dieses durch einfache Trocknung gewonnene Hefenmaterial steht hinsichtlich seiner Empfindlichkeit gegen fremde Zusätze gewissermaßen in der Mitte zwischen frischen Hefen und zellfreien Säften.

In nachstehender Tabelle h sind einige Versuche verzeichnet, die das Verhalten von zwei obergärigen Trockenhefen (M und XII)[2]), sowie einer untergärigen Trockenhefe (Münchner

---

[1]) Buchner, Die Zymasegärung S. 193.

[2]) Dieselben waren durch 24stündige Trocknung im Faustschen Apparat bei 20 bis 25° aus glykogenarmen Ausgangsmaterial gewonnen; daher ist überall auch die Selbstgärung geringfügig.

Bierhefe) gegen Zucker und Brenztraubensäure in Gegenwart von Antisepticis zum Ausdruck bringen. (Des Vergleiches halber ist auch die Einwirkung derselben drei Trockenhefen auf Zucker angeführt.)

h)

	CO_2 aus 1%iger Glucoselsg. i. Gegenw. von Chloroform nach		CO_2 aus 1%iger Brenztraubensäurelösung in Gegenwart von Chloroform und Borat nach		CO_2 allein aus Trockenhefe u. Chloroformwasser nach	
	24 Std. ccm	48 Std. ccm	24 Std. ccm	48 Std. ccm	24 Std. ccm	48 Std. ccm
Trockenhefe M . .	0	0	8,5	10,0	0	0
Trockenhefe XII .	0	0	7,0	7,5	0	Spur
Münch. Trockenhefe	0	Spur	7,5	8,0	Spur	0,5

Die analoge Versuchsreihe mit Toluol an Stelle von Chloroform ergab, daß bei Gegenwart von Toluol reichliche Gärung auch von Traubenzucker eintrat. Keine der drei Trockenhefen vermochte 1%ige freie Brenztraubensäure in Gärung zu versetzen. Die Verwendung von Arsenit (an Stelle von Borat, Tabelle h) neben Chloroform verhinderte die Gärung mit den drei Trockenhefen völlig. Ohne Gegenwart eines Antisepticums vergoren alle drei Präparate eine 1%ige Glucoselösung kräftig in 14 Stunden.

Ein Blick auf die Tabelle h lehrt, daß auch hier die Brenztraubensäure in Gegenwart von Chloroform in Gärung gerät, während Traubenzucker völlig unangegriffen bleibt. Bei dieser Versuchsanordnung ergaben eindeutige Resultate jene Brenztraubensäurelösungen, deren Acidität mit Borsäurepuffern hergestellt war.

Die Entstehung der Kohlensäure bei der alkoholischen Gärung ist nur durch Loslösung aus einer Carbonsäure verständlich; sie findet wohl[1]) ihre ungezwungenste Erklärung in der Wirkung von Carboxylase auf Brenztraubensäure. Es ist deshalb besonders beachtenswert, daß nach den zuvor mitgeteilten Ergebnissen diese Kohlensäureabspaltung noch unter Bedingungen erfolgt, wo die Zymase versagt. Ist aber die Carboxylase ein Teilenzym des Fermentsystems Zymase, so ergibt sich daraus die notwendige Folgerung, daß der Abbau des Zuckers in Stufenreaktionen stattfindet. Die Phase (oder eine der Phasen), durch welche die sechsglied-

[1]) Vgl. C. Neuberg und J. Kerb, diese Zeitschr. 47, 405, 1912.

rige Kohlenstoffkette in die dreigliedrige übergeführt wird, kann gestört sein, während der Abbau von C_3 ungehindert funktioniert.

Diese Schlußfolgerung wäre für die Auffassung des enzymatischen Zuckerabbaues von einschneidender Bedeutung. Bevor man sie akzeptiert, wird man noch auf anderem Wege Beweise zu erbringen suchen für die gesonderte Existenz der Carboxylase neben jenem Enzymkomplex, der C_6 in C_3, Zucker in Brenztraubensäure, umformt. Im Laufe der Jahre haben wir noch einige weitere Differenzen zwischen den beiden Fermentvorgängen kennen gelernt und berichten darüber im folgenden.

B. Verschiedenartige Unterschiede in der Wirkung von Carboxylase und Zymase.

I. Zeitliche Unterschiede in der Wirkung von Carboxylase und Zymase.

Wir haben früher mehrfach hervorgehoben, daß Brenztraubensäure und Glucose von lebender Hefe angenähert gleich schnell vergoren werden. Ohne feinere Messungen, die wir noch vornehmen wollen, lassen sich gröbere Unterschiede in der Geschwindigkeit nicht ohne weiteres erkennen. Ganz anders aber liegen die Verhältnisse, wenn man zur zellfreien Gärung übergeht.

Versetzt man Hefemacerationssaft mit $1\,^0/_0$iger reiner Brenztraubensäure oder mischt ihn mit gleichen Teilen $1\,^0/_0$iger wässeriger Brenztraubensäurelösung, so trübt er sich mehr oder minder stark infolge Ausscheidung von Eiweiß, das sich oft nach einiger Zeit zu Flocken zusammenballt. Füllt man solche Gemische, unbekümmert um ein aufgetretenes Eiweißgerinnsel, in Schröttersche Gärröhrchen und versenkt diese — nach Verlängerung des kurzen Schenkels mit einem Ansatzstück in der früher von uns beschriebenen Weise[1]) — in ein Becherglas mit Wasser von 37^0, so bemerkt man nach 2 bis 8 Sekunden den Beginn einer Gasentwicklung. Dieselbe hält in der Regel etwa $^1/_2$ Stunde an und liefert ungefähr 2 ccm Gas, das sich als reines Kohlendioxyd zu erkennen gibt, während gleichzeitig

[1]) C. Neuberg und J. Kerb, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 44, 2477, 1911.

Acetaldehyd im Gärgut nachweisbar wird. In dieser Zeit lieferten unsre Hefemacerationssäfte, die mit einer gleichen Menge 1⁰/₀iger Glucoselösung[1]) vermischt waren, niemals auch nur eine Spur Kohlendioxyd. Mit den von uns benutzten Macerationssäften haben wir bei Zusatz des gleichen Quantums 1⁰/₀iger Zuckerlösung vor 3 Stunden selten eine Gasentwicklung konstatieren können[2]); bisweilen setzte sie erst nach 6 Stunden, gelegentlich auch noch später ein.

Der Unterschied in der Zeit, in der die zellfreie Vergärung von Brenztraubensäure einerseits, von Glucose andererseits einsetzt, ist ein ganz gewaltiger. Legt man die Zahlen 5 Sekunden und 3 Stunden zugrunde, so ergibt sich, daß zellfreier Saft aus Brenztraubensäure mehr als 2000mal so schnell Kohlensäure entwickeln kann als aus Zucker.

Wie zuvor erwähnt, hört die Kohlensäurebildung für gewöhnlich innerhalb 2 Stunden auf. Es scheint dies darauf zu beruhen, daß die freie Brenztraubensäure in dem Hefesaft Schädigungen der Enzyme verursacht. Denn man kann die Gasentwicklung meistenteils länger in Gang halten, wenn man die Acidität nach dem Pufferprinzip durch arsenige Säure oder Borsäure reguliert. Es gelingt dann, Mischungen von Saft und Brenztraubensäure herzustellen, in denen nur eine schwache Trübung, aber keine Eiweißausflockung auftritt.

Mit der längeren Dauer der Entwicklung steigt natürlich auch die Menge des Kohlendioxyds.

II. Ungleiche Empfindlichkeit von Carboxylase und Zymase beim Aufbewahren von Macerationssaft.

Nach den Erfahrungen von Buchner an Hefepreßsaft und von v. Lebedew an Macerationssaft nimmt die Zymasewirkung beim Aufbewahren ab und verschwindet, namentlich bei Zimmertemperatur, in 1 bis 2 Tagen.

Versetzt man Macerationssaft, der durch 36 bis 48stündige Lagerung bei Zimmertemperatur (18 bis 22⁰) sein Ver-

[1]) Fruchtzucker und Saccharose verhalten sich nach vorläufigen Versuchen ähnlich.

[2]) Auch Buchner gibt für Hefepreßsaft und namentlich von Lebedew (Ann. de l'Inst. Pasteur 26, 16, 1912) für Hefemacerationssaft an, daß die Gärwirkung auf Zucker (Saccharose) öfter erst nach einiger Zeit einsetzt, manchmal erst nach 24 Stunden.

gärungsvermögen für Traubenzuckerlösungen eingebüßt hat, mit Brenztraubensäure, so geraten diese Proben trotzdem in Gärung. Die Kohlendioxydentwicklung aus Brenztraubensäure ist meist nur wenig schwächer, als sie mit demselben Saft[1]) in frischem Zustande war.

i)

Hefemacerationssaft gelagert	CO_2 aus der Mischung von Saft mit der gleichen Menge		CO_2 bei Zusatz von 1 % festem Rohrzucker zu Saft	CO_2 in der Kontrollprobe: Saft mit der gleichen Menge H_2O
	1 %iger Brenztraubensäurelösung	1 %iger Glucoselösung		
2 Tage bei 22°	Gärt sofort Nach 16 Std.: 4 ccm „ 20 „ : 5 „	Nach 16 Std.: 0 ccm „ 20 „ : 0 „	—	Nach 16 Std.: 0 ccm „ 20 „ : 0 „
36 Std. bei 20 bis 22°	Gärt sofort Nach 22 Std.: 3 ccm	—	Nach 22 St.: 0 ccm[2])	„ 22 „ : 0 „[3])
2 Tage bei 20°	„ 12 „ : 3 „ „ 36 „ : 6 „	Nach 12 Std.: 0 ccm „ 36 „ : 0 „	„ 12 „ : 0 „ [2]) „ 36 „ : 0 „	„ 12 „ : 0 „ „ 36 „ : 0 „
1 Tag bei 18 bis 22°	Unter Zusatz von Chloroform. Nach 16 Std.: 5 ccm „ 40 „ : 6 „	Unter Zusatz von Chloroform. Nach 16 Std.: 0 ccm „ 40 „ : 0 „	—	„ 16 „ : 0 „ „ 40 „ : Spur
15 Std. im Brutschrank bei 37°	„ 24 „ : 5 „[4])	„ 24 „ : 0 „[4])	—	„ 24 „ : 0 ccm[4])
15 Std. bei 20°	Unter Zusatz von Chloroform u. Borat[5]) Nach 15 Std.: 3 ccm	Unter Zusatz von Chloroform. Nach 15 Std.: 0 ccm	—	Unter Zusatz von Chloroform. Nach 15 Std.: 0 ccm
4 Tage bei 15 bis 19°	Unter Zusatz von Borat. Nach 36 Std.: 2 ccm	„ 36 „ : Spur	—	„ 36 „ : Spur

[1]) Es kommt manchmal vor, daß die Gemische von Saft und Brenztraubensäure, selbst wenn sie anfangs nur mäßig getrübt sind, beim Stehen völlig zu einer Gallerte erstarren. Dieselbe kann so steif sein, das jede Gasentwicklung aufgehoben wird. Diese Proben sind dann verloren. Der Eintritt dieser Erscheinung hängt von dem zufälligen Eiweiß- und Salzgehalt der Säfte ab, der schon in den einzelnen Proben des Ausgangsmaterials, der Trockenhefen, natürlich schwankt. Bisweilen verwandelt sich die Gallerte nach einigen Stunden in ein Gerinnsel, das eine goldgelbe klare Flüssigkeit auspreßt; dann kann man wieder eine etwa eingetretene CO_2-Ansammlung wahrnehmen.

[2]) Invertinhydrolyse des Rohrzuckers war erfolgt.

[3]) Saft unverdünnt.

[4]) Gärung bei 20°.

[5]) Ohne Borat mit Chloroform trat keine Gärung ein.

Zu den Versuchen der Tabelle i wurden 8 ccm Saft mit 8 ccm der 1 $^0/_0$igen Brenztraubensäure, bzw. 8 ccm 1 $^0/_0$iger Glucoselösung versetzt; gelegentlich wurden auch 0,15 g festen Rohrzuckers in 15 ccm des gelagerten Saftes gelöst.

In einigen Fällen haben wir beobachtet, daß nach 48stündiger Aufbewahrung noch ein Rest von Gärvermögen bestand gegen Glucoselösung und namentlich gegen Rohrzucker, der in fester Form in dem gelagerten Saft gelöst worden war. Die Gärung trat dann namentlich nach längerem Aufenthalt im Brutschrank, nach 24 Stunden, ein und war nur schwach. (Die Vergärung der Brenztraubensäure setzte dagegen auch mit diesen Säften rasch, oft fast augenblicklich ein.) Um Selbstgärung handelte es sich nicht. Denn wie schon v. Lebedew[1]) betont hat und wir bestätigen können, zeigt richtig bereiteter Macerationssaft keine Selbstgärung. Bisweilen vergärt ein 48 Stunden bei 17 bis 20° aufbewahrter Macerationssaft Zucker sogar noch kräftig, offenbar dann, wenn der Saft sehr reich an Zymase und Schutzstoffen für dieselbe ist. Solche Säfte, die sich bei den Kontrollen mit Zucker zu erkennen geben, scheiden natürlich aus.

III. Ungleiche Hitzebeständigkeit von Carboxylase und Zymase.

Noch schneller als beim Lagern verschwindet die Zymase aus zellfreien Säften bei Erwärmung. Buchner[2]) führt an, daß gärwirksamer Saft aus Unterhefe bei 40 bis 50° Eiweißgerinnsel ausscheidet und nach Filtration von diesen keine Gärkraft mehr besitzt. Erwärmt man Macerationssaft im Wasserbad 10 bis 15 Minuten auf 50 bis 51°, so erfolgt eine Gerinnung, wie sie schon v. Lebedew in der ausgezeichneten Beschreibung seines Macerationssaftes angibt. Filtriert man die trübe Mischung durch grobes Filtrierpapier, so erhält man eine goldgelbe wasserklare Flüssigkeit, die mit der gleichen Menge 1 bis 2 $^0/_0$iger Brenztraubensäure deutlich in Gärung gerät. Dieselbe ist so kräftig, daß sie bei nicht zu niederer Zimmertemperatur (20°) auch außerhalb des Brutschrankes beobachtet werden kann. Traubenzuckerlösung versetzt dieser auf 50° erwärmte Saft nicht mehr in Gärung; die Zymase ist inaktiviert.

Löst man dagegen in dem Saft festen Rohrzucker, so beobachtet man manchmal bei längerer Aufbewahrung noch ein schwaches Gärvermögen für Saccharose. Da Eiweiß- und Fermentgehalt der Macerationssäfte schwanken, so kann man sich auch hier vorstellen, daß kleine Mengen von Zymase der Inaktivierung bei 50 bis 51° entgehen, während die

[1]) A. v. Lebedew, l. c.

[2]) Buchner, Die Zymasegärung S. 35.

Gärkraft jedenfalls so stark vermindert ist, daß bei Vermischung mit 1 %iger Zuckerlösung keine Gasentwicklung mehr erfolgt.

Die Gewinnung gärkräftiger Carboxylaselösung gelingt auch noch aus Macerationssäften, die vorher 24 Stunden bei Zimmertemperatur oder 4 Tage bei + 2° aufbewahrt sind und erst dann auf 50 bis 51° erhitzt werden.

Die Carboxylase ist in den bei 50° von Zymase befreiten Säften, die wir kurz als „inaktivierte Säfte" bezeichnen wollen, tagelang nachweisbar, wenn der vom Wärmekoagulum abfiltrierte Saft dann unter Zusatz von wenig Toluol im Eisschrank lagert. Eine Trübung oder Ausscheidung erfolgt beim Stehen in der Kälte nicht oder kaum, obgleich der so vorbehandelte Saft noch viel Eiweiß enthält, das bei längerem Erwärmen auf 50° oder höhere Erhitzung (auf 100°) sowie durch die üblichen Proteinreaktionen nachgewiesen werden kann. Der längere Zeit (20, 40, 60 und 90 Minuten) auf 51° erwärmte und durch Absaugen vom starken Koagulum getrennte Saft vergärt Brenztraubensäure noch deutlich, nicht

k)

Macerationssaft, inaktiviert bei 50 bis 51°	CO_2 aus der Mischung von inaktiviertem Saft mit der gleichen Menge				
	1 %iger Brenztraubensäurelösung ccm	1,6 %iger Brenztraubensäurelösung + Arsenit ccm	1,6 %iger Brenztraubensäurelösung + Borat ccm	1 %iger Glucoselösung ccm	1 %iger Rohrzuckerlösung ccm
Frischer Saft, frisch inaktiviert	Nach 30 Min.: 5 15 Std.: 5,5 24 Std.: 5,5	Gärt sofort. Nach 24 Std.: 4	Nach 24 Std.: 0,5	Nach 30 Min.: 0 15 Std.: 0 24 Std.: 0	—
do.	Nach 15 Std.: 5,5	Nach 10 Min.: 1 15 Std.: 6	Nach 15 Std.: 1	Nach 15 Std.: 0	0
do., dann 5 Tage im Eisschrank belassen	Nach 16 Std.: 5	—	Nach 16 Std.: 1	Nach 16 Std.: 0	Nach 16 Std.: Spur
4 Tage alt, dann inaktiviert und sofort geprüft	Gärt sofort. Nach 36 Std.: 6	—	—	Nach 36 Std.: 0	Nach 36 Std.: 0
18 Std. alt, dann inaktiviert und sofort geprüft	Nach 30 Min.: 0,5 24 Std.: 6,0	Nach 30 Min.: 3 24 Std.: 6,5	—	Nach 24 Std.: 0	—

mehr dagegen der schnell auf 90° erhitzte. Weitere Intervalle sind vorläufig nicht geprüft. Bemerkenswert ist, daß der inaktivierte Saft auch bei der Temperatur seiner Inaktivierung, bei 50°, mit Arsenit gepufferte Brenztraubensäure zerlegt.

Um zu sehen, ob die Nichtvergärung der Zuckerlösungen etwa auf dem Fehlen von H-Ionen beruhe, die ja in den Brenztraubensäurelösungen vorhanden sind, wurde den Gemischen von Zuckerlösungen und inaktiviertem Saft Milchsäure bis zu einem Gehalt von 0,5% zugesetzt. Auch dann trat keine Gärung ein.

Auffallend ist, daß Boratgemische bei den inaktivierten Säften keine günstige Wirkung zu entfalten scheinen, während Arsenit hier meistens fördert.

IV. Ungleiche Empfindlichkeit von Carboxylase und Zymase gegen Dialyse.

Dialysiert man 100 ccm Macerationssaft in einem Pergamentpapierdialysator 2½ Tage gegen Leitungswasser, wobei man durch Zusatz von Toluol und Vornahme der ganzen Prozedur im Eisschranke einer Fäulnis vorbeugt, so verliert ein derart behandelter Saft seine Gärkraft für Zucker, vermag jedoch noch Brenztraubensäure zu zerlegen. Diese Vergärung der Brenztraubensäure wird erst nach 30 Stunden deutlich.

Für Hefepreßsaft haben Buchner und Antoni[1]) angegeben, daß er durch 48stündige Dialyse gärunwirksam auf Rohrzucker wird, daß jedoch durch Zugabe des vorsichtig eingeengten Dialysats zum Dialysenrückstand das Gärvermögen wieder hergestellt wird. Dieses von den genannten Autoren für Hefepreßsaft konstatierte Verhalten haben wir bei dialysiertem Macerationssaft nicht beobachten können. Wir

1)

CO_2 aus der Mischung von dialysiertem Saft mit der gleichen Menge					
1%iger Brenztraubensäurelösung ccm	1,6%iger Brenztraubensäurelösung + Arsenit ccm	1,6%iger Brenztraubensäurelösung + Borat ccm	1%iger Glucoselösung ccm	1%iger Rohrzuckerlösung ccm	Wasser ccm
Nach 20 Std.: 0 30 „ 1,5 44 „ 5	Nach 20 Std.: 0 30 „ 2,5 44 „ 5	Nach 20 Std.: Spur 30 „ 3 44 „ 7	Nach 20 Std.: 0 30 „ 0 44 „ Spur	Nach 20 Std.: 0 30 „ 0 44 „ 0	Nach 20 Std.: 0 30 „ 0 44 „ Spur
Nach 20 Std.: 0 42 „ 0	—	Nach 20 Std.: 6 42 „ 6,5	Nach 20 Std.: 0 42 „ 0	Nach 20 Std.: 0 42 „ Spur	Nach 20 Std.: 0 42 „ 0

[1]) E. Bucher und W. Antoni, Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 206, 1905; **46**, 141, 1905.

haben jedoch nur 2 Versuche nach dieser Richtung hin angestellt, da die Verwirklichung des Vorganges für unsere Zwecke gleichgültig war. Da wir zum Einengen der dialysierten Außenflüssigkeit 24 Stunden gebrauchten, war der nichtdialysierende Anteil vielleicht inzwischen durch andere Faktoren zu sehr geschwächt; wir bemerken jedoch, daß er in Brenztraubensäurelösung noch nach 2 Tagen eine, wenn auch schwache Gärung hervorrief.

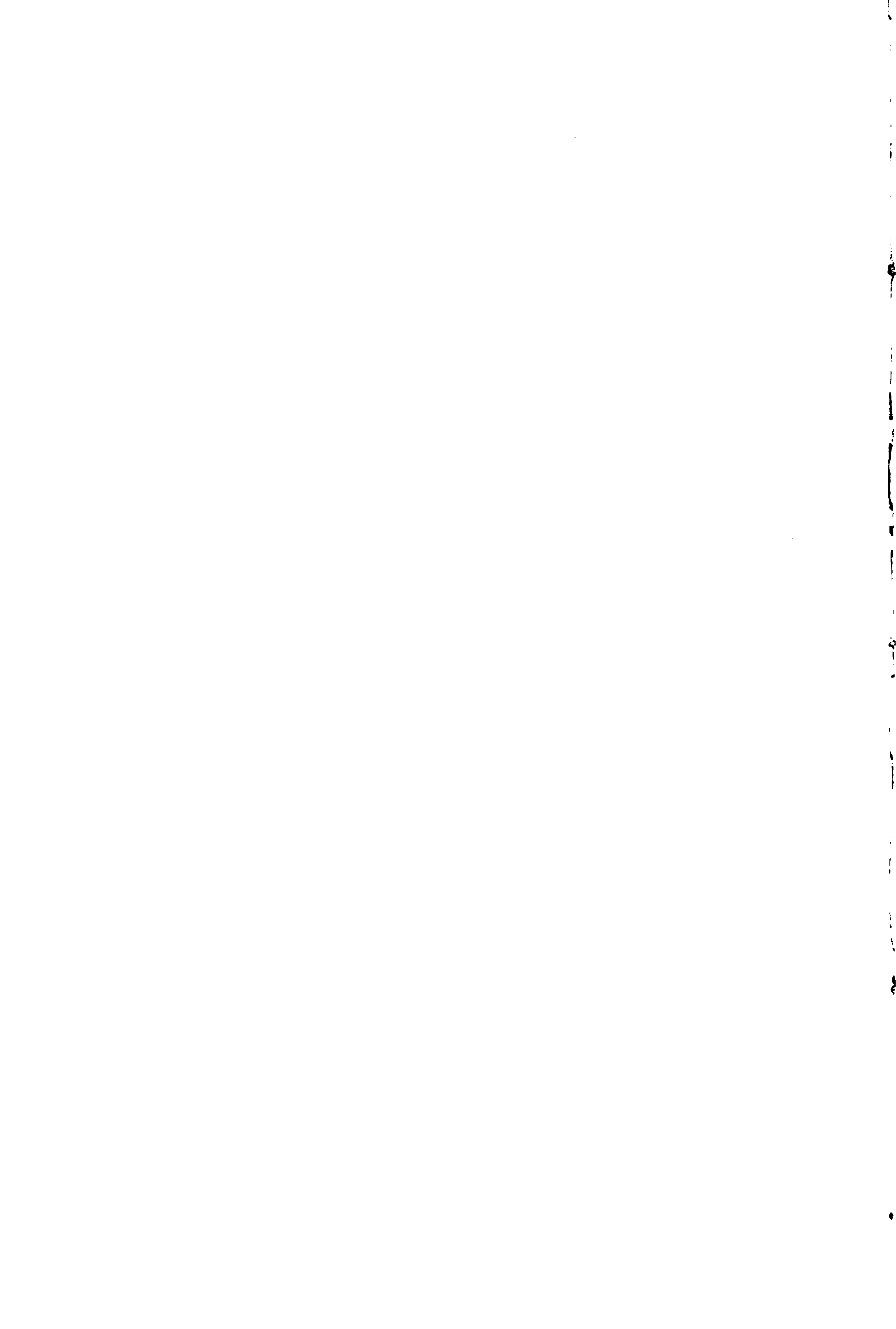
Die 60 Stunden dialysierten Säfte sind opak, sie wurden ohne vorherige Filtration verwendet. Beim Aufbewahren im Eisschrank verdichtet sich die Trübung zu einem flockigen Niederschlag.

Die mitgeteilten Versuche tun dar, daß die Carboxylase im Vergleich zur Zymase ein recht beständiges Ferment ist und überhaupt beträchtliche Resistenz aufweist.

Die Faktoren, welche die Differenzierungen ermöglicht haben, sind ungleicher Art. Die Verschiedenheiten, die beim Aufbewahren und bei der Dialyse der Enzymsäfte zutage treten, kann man vielleicht auf den Verlust an Coferment zurückführen, das für die Zymasewirkung erforderlich, für die Carboxylasetätigkeit unnötig ist. Dagegen können die Differenzen in den Zeitverhältnissen, in der Hitzebeständigkeit und in der Empfindlichkeit gegen antiseptische Mittel kaum damit in Zusammenhang gebracht werden.

Ausgedehnte Untersuchungen über die Carboxylase, die im Gange sind, werden vielleicht auch auf diese Punkte ein Licht werfen. Wir möchten die Hoffnung aussprechen, dies von uns erschlossene Gebiet noch einige Zeit selbst bearbeiten zu können.





Beiträge zur Kenntnis der Narkose.

I. Mitteilung.

Kritische Übersicht über die Beziehungen zwischen Narkose und Sauerstoffatmung.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 29. April 1913.)

1.

Der Gedanke, daß zwischen Narkose und Sauerstoffatmung Beziehungen, vielleicht sogar kausaler Natur, bestehen, ist alt und stammt schon aus der ersten Zeit allgemeinerer Anwendung der Narkose [vgl. Cl. Bernard[1])]; aber diese Beziehungen wurden an falscher Stelle gesucht, in äußeren Momenten, Behinderung der Atmung bei Inhalationsnarkosen, Anämie oder Blutstauung im Gehirn u. dgl., Erscheinungen, die, wie leicht zu zeigen, mit dem eigentlichen Vorgang der Narkose nichts zu tun haben. Von den theoretischen Vorstellungen seiner Biogenhypothese aus hat Max Verworn als Erster den Gedanken gehabt, nach Beziehungen zwischen der Narkose und den im Inneren der Zellen sich abspielenden Oxydationsvorgängen zu suchen, und auf seine Veranlassung habe ich[2]) im Jahre 1901 die ersten Untersuchungen über den Einfluß der Narkose auf die Sauerstoffatmung angestellt. Seit jener Zeit ist eine große Zahl von Arbeiten über diesen Gegenstand erschienen, so daß es wohl zweckmäßig sein dürfte, eine Zu-

---

[1]) Cl. Bernard, Leçons sur les anesthésiques et sur l'asphyxie. Paris 1875. S. 94f.

[2]) H. Winterstein, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. 1, 19, 1902.

sammenstellung der hierbei zutage geförderten Tatsachen zu geben.

Es scheint mir hierbei von Wichtigkeit, diese Zusammenstellung rein objektiv nach Möglichkeit auf die Tatsachen zu beschränken und diese jedes hypothetischen Gewandes zu entkleiden, das sie vielfach in den aus dem Verwornschen Laboratorium stammenden Arbeiten zeigen, und das für den mit den zugrunde gelegten Vorstellungen nicht genügend Vertrauten leicht ihre wahre Bedeutung zu verhüllen vermag. Aus diesem Grunde sollen auch die dort immer wiederkehrenden Ausdrücke „Assimilation“ und „Dissimilation“ völlig vermieden werden. Einen präzisen Sinn kann mit diesen Ausdrücken überhaupt nur derjenige verbinden, der auf dem Standpunkte der Biogen- oder einer ähnlichen Hypothese steht, die das Wesen der Lebensvorgänge in dem Aufbau und Zerfall eines komplizierten Riesenmoleküls sieht, in dessen Gefüge auch der Sauerstoff eintritt. Dann ist der mit O_2-Aufnahme einhergehende Aufbau ein „assimilatorischer“, der zu CO_2- und H_2O-Bildung führende Zusammenbruch ein „dissimilatorischer“ Vorgang. Wohl die überwiegende Mehrzahl der Forscher dürfte diesen Vorstellungen ablehnend gegenüberstehen und in den vitalen Oxydationen etappenweise ablaufende chemische Reaktionen sehen, bei denen wahrscheinlich zuerst anoxybiotische Spaltungen auftreten, deren Produkte zum Teil dann einer (wohl auch erst stufenweisen) Oxydation unterliegen. Die Oxydation derartiger Spaltungsprodukte als „Assimilation“ zu bezeichnen, hätte offenbar gar keinen Sinn. Wir werden unabhängig von jeder Hypothese, wenn wir einfach die beiden unzweifelhaft existierenden Kategorien von Prozessen unterscheiden, solche, die ohne Aufnahme freien Sauerstoffs ablaufen, und solche, die mit einer Sauerstoffzehrung einhergehen. Die ersteren sollen als anoxybiotische, die zweiten als oxybiotische bezeichnet werden, wobei kaum erst darauf hingewiesen zu werden braucht, daß auch die ersteren im chemischen Sinne zum Teil Oxydationsvorgänge darstellen können. Die ersteren würden der dissimilatorischen, die zweiten der assimilatorischen Phase der Verwornschen Nomenklatur entsprechen; die ersteren erzeugen chemische Gleichgewichtsstörungen, zu deren Beseitigung (bei den oxybiotisch lebenden Organismen) eine Aufnahme

äußeren Sauerstoffs erforderlich ist, d. h. sie verursachen das „Sauerstoffbedürfnis" des Organismus, die zweiten „befriedigen" dieses Bedürfnis, indem sie die Störung beseitigen.

Aus meinen ersten Versuchen ergab sich, daß Frösche, die durch Durchspülen mit O_2-armer Salzlösung erstickt worden waren, sich nicht erholen konnten, wenn die O_2-Zufuhr in Narkose erfolgte; daraus geht hervor, daß durch die Narkose die oxybiotischen Prozesse auch bei maximalem O_2-Bedarf gehemmt sind. Ganz die gleichen Versuche wie von mir am Zentralnervensystem des Frosches wurden von Fröhlich[1]) am peripheren Froschnerven und von Nagai[2]) am Flimmerepithel des Frosches ausgeführt, durchwegs mit dem gleichen Ergebnis. Diese Versuche sind deshalb von grundlegender Bedeutung, weil sie den ersten Beweis einer direkten hemmenden Wirkung der Narkose auf die Oxydationsprozesse erbringen, während zahlreiche spätere Beobachtungen über eine Herabsetzung der letzteren die Deutung zuließen, daß die Verminderung der Oxydationen erst sekundär durch die primäre Verminderung der anoxybiotischen Prozesse (des „O-Bedarfs") bedingt sei.

Daß eine solche Deutung (wenn man von der durch die Aufhebung der „Tätigkeit" [Körperbewegungen usw.] bewirkten Verminderung des Stoffumsatzes absieht) auch sonst unzutreffend wäre, ergibt sich auch aus den weiteren Versuchen von Fröhlich sowie jenen von Bondy. Fröhlich (l. c.) zeigte nämlich am peripheren Nerven und Bondy[3]) am Zentralnervensystem des Frosches, daß die Erstickung in einem O_2-freien Medium während der Narkose ebenso rasch vor sich geht wie ohne eine solche, woraus sich der Schluß ergibt, daß die zur Erstickung führenden anoxybiotischen Prozesse in der Narkose anscheinend ungestört weitergehen. Die Versuche wurden freilich ursprünglich ganz anders gedeutet, nämlich als ein „Herausdiffundieren des Sauerstoffs" aus seinen „Depots" bei Er-

---

[1]) Fr. W. Fröhlich, Zur Kenntnis der Narkose des Nerven. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3, 75, 1904.

[2]) H. Nagai, Erstickung und Narkose des Flimmerepithels. Ebenda 5, 34, 1905.

[3]) O. Bondy, Untersuchungen über die Sauerstoffaufspeicherung in den Nervenzentren. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3, 180, 1904.

niedrigung des O_2-Partialdruckes; allein abgesehen davon, daß diese angeblichen Depots im Zentralnervensystem nachweislich nicht existieren[1]), kann diese Deutung auch von der Verwornschen Schule heute nicht mehr aufrechterhalten werden, weil sie mit den gleich zu erwähnenden Beobachtungen über Erstickung in der Narkose bei O_2-Anwesenheit völlig unvereinbar wäre. Zu der Schlußfolgerung, „daß die Narkose den Bedarf an Oxydationsprozessen nicht oder wenigstens nicht in demselben Maße herabsetzt wie die Ausführbarkeit derselben"[2]), wurde ich zuerst durch Beobachtungen über die gleichzeitige Einwirkung von Wärme und Narkose geführt. Ich hatte gefunden[3]), daß die bei Einwirkung höherer Temperatur auftretende „Wärmelähmung" des Frosches auf einer Erstickung beruht, und beobachtete[4]), daß der Eintritt dieser Wärmeerstickung durch gleichzeitige (unvollkommene) Narkose beschleunigt wird, was bei gleichzeitiger Verminderung auch des O_2-Bedürfnisses nicht der Fall sein könnte. Diese Beobachtungen erscheinen mir allerdings heute nicht beweiskräftig. Ich hatte auf Grund entsprechender Ausführungen Overtons[5]) angenommen, daß der Teilungskoeffizient der Narkotica bei Erwärmung keine beträchtlichen Änderungen erfährt. Diese Annahme ist jedoch irrig; denn wie H. Meyer[6]) in Versuchen, die zu den besten Argumenten der Meyer-Overtonschen Theorie gehören, gezeigt hat, ändert sich der Teilungskoeffizient und damit die Wirkungsstärke mancher Narkotica bei Änderung der Temperatur sehr beträchtlich und steigt beim Alkohol, mit dem die erwähnten Versuche angestellt waren, mit Erhöhung der Temperatur, so daß dieses Moment allein vielleicht den früheren Eintritt der Lähmung zu erklären vermag. Trotzdem war die Schlußfolgeruug richtig,

---

[1]) H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Ebenda 6, 314, 1907.

[2]) H. Winterstein, Wärmelähmung und Narkose. Ebenda 5, 342, 1905.

[3]) H. Winterstein, Über die Wirkung der Wärme usw. Ebenda 1, 129, 1902.

[4]) H. Winterstein, Wärmelähmung und Narkose. Ebenda 5, 323, 1905.

[5]) H. Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901. S. 60.

[6]) H. Meyer, Zur Theorie der Alkoholnarkose. 3. Mitteil. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 46, 338, 1901.

wie neuerdings aus dem Verwornschen Laboratorium hervorgegangene Untersuchungen auf das überzeugendste dartun.

Wenn die Narkose nämlich die oxybiotischen Prozesse hemmt, die anoxybiotischen dagegen nicht in dem gleichen Maße, dann muß offenbar in der Narkose allmählich eine Erstickung auch dann eintreten, wenn für ausreichende O_2-Zufuhr gesorgt ist, d. h. es muß bei lange fortgesetzter Narkose ein Lähmungszustand eintreten, dessen Beseitigung nach Aufhebung der Narkose nur in Anwesenheit von Sauerstoff, nicht aber in einem O_2-freien Medium möglich ist. Ein (von etwas anderem Gedankengange aus) schon von Bondy (l. c.) am Zentralnervensystem des Frosches unternommener Versuch hatte allerdings ein negatives Ergebnis, aber Heaton[1]) ist später am peripheren Froschnerven der Nachweis gelungen, daß das theoretisch postulierte Verhalten hier tatsächlich zu beobachten ist, und daß der Nerv während fortgesetzter Narkose in Luft (also trotz O_2-Anwesenheit) in der gleichen Weise erstickt wie in einem O_2-freien Gas. In Zusammenhang damit steht wohl auch die neuerdings von Ishikawa[2]) mitgeteilte Beobachtung, daß bei Amöben die in der Narkose entstandene Lähmung der spontanen Bewegungen überhaupt nur in Anwesenheit von Sauerstoff wieder behoben werden kann, nicht aber in einem O_2-freien Medium.

Heaton hat aber noch eine andere höchst überraschende Tatsache aufgedeckt, nämlich die, daß anhaltende Reizung des Nerven während der Narkose, trotzdem sie keinerlei Wirkung auf den Erfolgsapparat ausübt, eine deutliche Abkürzung der Erstickungszeit gegenüber dem nicht gereizten narkotisierten Nerven herbeiführt, d. h. also, daß in der Narkose die anoxybiotischen Prozesse nicht bloß wie gewöhnlich ablaufen, sondern durch Reizung sogar eine Steigerung erfahren können, ohne daß diese in einer äußeren Reaktion zum Ausdruck kommt, eine Beobachtung, die für unsere Vorstellungen von den Vorgängen der Erregung und Erregungsleitung sicher von größter Bedeutung ist.

---

[1]) T. B. Heaton, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. **10**, 53, 1910.

[2]) H. Ishikawa, Über die Wirkung der Narkose an Amöben. Ebenda **12**, 339, 1912.

Eine weitere Schlußfolgerung, die sich aus der ungleichmäßigen Beeinflussung der anoxybiotischen und oxybiotischen Stoffwechselvorgänge ergeben würde, wäre offenbar die, daß die Narkoselähmung bei gleichbleibender Konzentration des Narkoticums mit der Zeit eine Verstärkung erfahren muß, da eben die allmähliche Erstickung hinzukommt. Diese Schlußfolgerung habe ich bereits in meiner früher erwähnten Arbeit[1]) gezogen und auch experimentell bestätigen können, indem sowohl bei Mysis wie bei Rhizostoma eine unvollständige Alkoholnarkose allmählich im Verlaufe von Stunden zu einer vollständigen Lähmung führte, von der in frischem Wasser eine, wenn auch unvollständige Erholung erfolgte. Im Gegensatze hierzu würden allerdings Versuche von Overton[2]) stehen, der Kaulquappen tagelang in leichter Äthernarkose erhalten konnte[3]).

So bemerkenswerte Resultate die bisher erwähnten Versuche auch ergeben haben, so leiden sie doch an dem Übelstande, daß die aus ihnen geschöpften Kenntnisse über die Beeinflussung der Stoffwechselvorgänge durch die Narkose nicht durch direkte Untersuchung derselben gewonnen, sondern lediglich indirekt aus der Beobachtung der Erregbarkeits- und Reaktionsverhältnisse abgeleitet und daher mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind. Leider ist der Froschnerv, der ein

---

[1]) H. Winterstein, Wärmeleitung und Narkose. l. c. S. 343.

[2]) E. Overton, l. c. S. 83.

[3]) Szücs und Kisch (Über die kombinierte Wirkung von fluorescierenden Stoffen und Alkohol; Zeitschr. f. Biol. 58, 558, 1912) haben von folgendem Gedankengang aus den Einfluß eines Zusatzes von Äthyl alkohol auf die Giftwirkung untersucht, die eine Lösung von Methylen blau oder Eosin im Licht auf Colpidium colpoda ausübt: Nach Straub würden die sensibilisierenden Substanzen ihre Giftwirkung der Fähigkeit verdanken, oxydierend zu wirken; wenn nun andererseits die Narkotica oxydationshemmend wirken, dann wäre zu erwarten, daß der Zusatz eines Narkoticums die photodynamische Wirksamkeit abschwächt. Tatsächlich hatten Hausmann und Kolmer (Über die sensibilisierende Wirkung pflanzlicher und tierischer Farbstoffe auf Paramaecien; diese Zeitschr. 15, 12, 1909) eine Verlangsamung der Giftwirkung von Eosinlösungen bei Alkoholzusatz beobachtet. Szücs und Kisch hingegen fanden bei ihren Versuchen stets eine Steigerung der photodynamischen Wirkung unter dem Einfluß von Alkohol, der nach ihnen auch für sich allein im Lichte eine stärker narkotisierende Wirkung ausüben würde.

so vorzügliches Untersuchungsobjekt zum Studium der Erregbarkeitsverhältnisse darstellt, Stoffwechseluntersuchungen vorläufig kaum zugänglich. Den ersten direkten Nachweis einer Hemmung der oxybiotischen Vorgänge durch die Narkose habe ich (l. c. S. 335) an Medusen geliefert, die in CO_2-Narkose eine bedeutende Herabsetzung des O_2-Verbrauches erkennen ließen. In neuerer Zeit hat Warburg[1]) in einer Reihe von Untersuchungen, auf die wir später noch zurückkommen werden, an Seeigeleiern, Vogelerythrocyten, Hefezellen, Bakterien und Gewebszellen die oxydationshemmende Wirkung der Narkotica festgestellt und gefunden, daß diese in gleicher Weise wie die anästhesierende Wirkung dem Meyer-Overtonschen Verteilungsgesetz gehorcht. Unter seiner Leitung hat ferner Usui[2]) nachgewiesen, daß die Konzentration, in der die Narkotica ihre oxydationshemmende Wirkung entfalten, bei ganz verschiedenartigen Zellen: Bakterien, Leberzellen, Stücken des Zentralnervensystems, annähernd die gleiche ist. Rhode und Ogawa[3]) stellten am überlebenden Säugetierherzen eine von der Pulsverlangsamung unabhängige Herabsetzung des O_2-Verbrauches unter der Einwirkung von Chloralhydrat fest, und Vernon[4]) untersuchte kürzlich die Verminderung der Gewebsatmung und die Zerstörung der Indophenoloxydase unter dem Einfluß einer großen Zahl von Narkotica.

Außer durch die Herabsetzung des O_2-Verbrauches bei der Gewebsatmung ist die oxydationshemmende Wirkung der Narkotica auch noch durch andere Stoffwechseluntersuchungen festgestellt worden. So beobachteten Baer und Meyerstein[5]),

---

[1]) O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305, 1910; **69**, 452, 1910; **70**, 413, 1910; Münch. med. Wochenschr. **58**, 289, 1911; **59**, 2550, 1912. — Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465, 1912.

[2]) R. Usui, Über Messung von Gewebsoxydationen in vitro (Leber, Zentralnervensystem). Arch. f. d. ges. Physiol. **147**, 100, 1912.

[3]) E. Rhode und S. Ogawa, Gaswechsel und Tätigkeit des Herzens unter dem Einfluß von Giften und Nervenreizung. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **69**, 200, 1912.

[4]) H. M. Vernon, The function of lipoids in tissue respiration and in the activity of oxidases. Journ. of Physiol. **45**, 197, 1912. — Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. Diese Zeitschr. **47**, 374, 1912.

[5]) J. Baer und W. Meyerstein, Über den Einfluß pharmakologischer Agenzien auf Oxydationsvorgänge im Organismus. Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **63**, 441, 1910.

welche die Oxydation von Buttersäure und Oxybuttersäure zu Acetessigsäure in der künstlich durchbluteten Leber unter dem Einfluß verschiedener Agenzien untersuchten, und ebenso Joannovics und Pick[1]), die das Jodbindungsvermögen der Äther-Alkohol-Extrakte der Leber normaler und einer längeren Narkose unterworfener Hunde miteinander verglichen, eine starke Herabsetzung der Oxydationsvorgänge in der Leber unter dem Einfluß narkotischer Mittel.

Die oxydationshemmende Wirkung der Narkotica ist vermutlich nicht einfach der Konzentration proportional; es scheint vielmehr nach einigen Angaben, daß sie in schwacher Konzentration sogar eine Steigerung der Atmungsintensität herbeizuführen vermögen. So haben schon vor längerer Zeit Laurén[2]) an Keimlingen, Zaleski[3]) an Gladioluszwiebeln ein Steigerung der CO_2-Ausscheidung unter dem Einfluß schwacher und eine Abnahme bei starker Äthernarkose beobachtet, und ebenso fand Gerber[4]) bei der Banane in einem bestimmten Stadium der Reife unter der Einwirkung von Äther und Chloroform eine Steigerung der Atmung bei unverändertem respiratorischen Quotienten. Baer und Meyerstein (l. c.) sahen einige der in starker Konzentration hemmend wirkenden Agenzien (z. B. Trichloräthylalkohol) eine beträchtliche Erhöhung der Oxydationen in der Leber herbeiführen; ebenso fand Vernon (l. c.) eine leichte Steigerung des Oxydationsvermögens der Gewebe unter dem Einfluß vieler in starken Dosen die Oxydase zerstörender Narkotica. Auch Grahe[5]) glaubt aus seinen unter Pütters Leitung an winterschlafenden Weinbergschnecken ausgeführten Gaswechselversuchen eine Steigerung der Atmungsintensität bei

---

[1]) G. Joannovics und E. P. Pick, Intravitale Oxydationshemmung in der Leber durch Narkotica. Arch. f. d. ges. Physiol. **140**, 327, 1911.

[2]) W. Laurén, Über den Einfluß von Ätherdämpfen auf die Atmung von Keimlingen. Helsingfors 1891 (schwedisch); ref. in Botan. Jahresber. **20**, 92, 1892.

[3]) W. Zaleski, Zur Frage über die Wirkung von Reizen auf die Atmung der Pflanzen (russisch); ref. in Botan. Centralbl. **95**, 251, 1904.

[4]) M. C. Gerber, Étude comparée de l'action des vapeurs d'amylène et d'éther sur la respiration des fruits charnus sucrés. Compt. rend. Soc. Biol. **54**, 1497, 1902.

[5]) K. Grahe, Untersuchungen über die Äthernarkose der Weinbergschnecke. Zeitschr. f. allg. Physiol. **13**, 111, 1911.

schwacher und eine Abnahme der O_2-Aufnahme unter gleichzeitiger Erhöhung der CO_2-Produktion bei starker Äthernarkose erschließen zu können[1]).

Außer durch die bisher erörterten Untersuchungen über den Einfluß der Narkose auf die Sauerstoffatmung wird das Vorhandensein enger Beziehungen zwischen beiden Vorgängen auch deutlich durch eine Reihe von Beobachtungen illustriert, die die Wirkung des O_2-Mangels und jene der Narkose auf den Ablauf verschiedener Lebenserscheinungen miteinander vergleichen und eine zum Teil sehr auffällige Übereinstimmung in der Wirkungsweise beider Faktoren ergeben haben. Insbesondere haben die eingehenden Untersuchungen von Fröhlich[2]) und Boruttau[3]) auf das Überzeugendste dargetan, daß in einem bestimmten Stadium der Narkose und einem solchen der Erstickung durch ein O_2-freies Medium Erregbarkeit und Leitfähigkeit des Froschnerven völlig gleichartige Veränderungen erfahren (Verlängerung des Refraktärstadiums, Ermüdbarkeit, Verlangsamung der Fortpflanzungsgeschwindigkeit, Dekrement

---

[1]) In Wirklichkeit beweisen diese Versuche nichts. Denn schon unter gewöhnlichen Bedingungen sind die beobachteten Schwankungen der O_2-Aufnahme und CO_2-Abgabe so ungeheuerlich (so betrug z. B. in fünf aufeinanderfolgenden Versuchsperioden der ersten Serie der respiratorische Quotient in der ersten: 13,9; in der zweiten: 3,88; in der dritten: 16,7; in der vierten war die O_2-Aufnahme = 0; in der fünften der respiratorische Quotient = 1,96!), daß ein ungewöhnlicher Optimismus dazu gehört, derartige Differenzen auf „individuelle Schwankungen“ und „veränderte Lebensbedingungen“ zu beziehen und nicht einfach auf Mangelhaftigkeit der Methodik. Unter solchen Bedingungen „Durchschnittswerte“ zu berechnen und diese dann mit dem einen in Narkose gewonnenen Werte zu vergleichen, der an sich meist durchaus in das Bereich dieser „individuellen Schwankungen“ fällt, ist natürlich ganz unstatthaft. Für die Theorie der Narkose wird übrigens auch derjenige die Resultate völlig unverwendbar finden, der sie im übrigen gläubig hinnimmt, da winterschlafende Schnecken nicht erkennen lassen, inwieweit bei den einzelnen Versuchen überhaupt eine „Narkose“ vorhanden war.

[2]) Fr. W. Fröhlich, Erregbarkeit und Leitfähigkeit der Nerven. Zeitschr. f. allg. Physiol. **3**, 148, 1904. — Die Verringerung der Fortpflanzungsgeschwindigkeit usw. Ibid. S. 455. — Die Ermüdung des markhaltigen Nerven. Ibid. S. 468.

[3]) H. Boruttau und Fr. W. Fröhlich, Elektropathologische Untersuchungen. I. Abhdl. Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 444, 1904.

usw.), und Fröhlich[1]) hat auch in dem Verhalten des Zentralnervensystems und des Herzmuskels derartige Analogien hervorgehoben. Ich habe auf die Übereinstimmung hingewiesen[2]), die in dem Auftreten eines der Lähmung vorangehenden Erregungsstadiums bei der Erstickung ebenso wie bei der Narkose der Warmblüter besteht. Baglioni[3]) hat festgestellt, daß die motorischen Mechanismen des Froschrückenmarks eine größere Resistenz aufweisen als die sensiblen, und zwar gleichfalls wieder sowohl gegenüber Erstickung wie gegenüber Narkose, da in beiden Fällen zuerst die sensiblen der Lähmung verfallen. In neuerer Zeit hat Mansfeld[4]) weitere Übereinstimmungen in der Wirkung von Narkose und O_2-Mangel beobachtet: Alcock[5]) hatte gefunden, daß Chloroform den Ruhestrom der Froschhaut aufhebt, wenn es auf die Außenfläche, nicht aber wenn es auf die Innenfläche der Haut appliziert wird. Mansfeld (2. Mitt.) beobachtete die gleiche Wirkung bei O_2-Entziehung, und zwar auch hier nur, wenn die Außenfläche von dieser betroffen wurde. Auch auf die Keimung von Kürbissamen (3. Mitt.) übt nach ihm temporäre O_2-Entziehung eine analoge Wirkung (erst Hemmung, später Beschleunigung) aus wie die Einwirkung verschiedener Narkotica. Zugunsten der Gleichartigkeit beider Wirkungen würde nach Mansfeld (1. Mitt.) auch die Beobachtung sprechen, daß eine an sich völlig unwirksame Paraldehydkonzentration bei Verminderung des O_2-Druckes in einem an sich gleichfalls unschädlichen Grade bei Kaulquappen eine tiefe, meist tödliche Narkose herbeiführt. Daß diese Versuche nicht beweisend sind, hat der Verfasser aber selbst zugegeben, da es sich einfach um eine Summation schädigender Einwirkungen gehandelt haben kann. Tatsäch-

---

[1]) Fr. W. Fröhlich, Das Prinzip der scheinbaren Erregbarkeitssteigerung. Zeitschr. f. allg. Physiol. **9**, 1909. Sammelreferat.

[2]) H. Winterstein, Wärmelähmung und Narkose, l. c., S. 347.

[3]) S. Baglioni, Zur Analyse der Reflexfunktion. Wiesbaden 1907. S. 78.

[4]) G. Mansfeld, Narkose und Sauerstoffmangel. 1. Mitt. Arch. f. d. ges. Physiol. **129**, 69, 1909; 2. Mitt., ibid. **131**, 457, 1910; 3. Mitt., ibid. **143**, 175, 1912.

[5]) N. H. Alcock, The action of anaesthetics on living tissues. Part II. The frog's skin. Proc. Roy. Soc. London (B) **78**, 159, 1906.

lich konnte Nothmann-Zuckerkandl[1]) einen verstärkenden Einfluß des O_2-Mangels auf die lähmende Wirkung, die verschiedene Alkohole auf die pflanzliche Protoplasmaströmung ausüben, nur bei Temperaturen von und über 30° beobachten, bei denen auch die Widerstandsfähigkeit gegen andere Gifte verschiedenster Art deutlich vermindert war. Schließlich wäre noch darauf hinzuweisen, daß verschiedene autolytische Prozesse durch O_2-Mangel eine Verstärkung zu erfahren scheinen und daß nach Chiari[2]) die Leberautolyse durch narkotische Dämpfe stark beschleunigt wird. Ebenso ließe sich die von Lesser[3]) studierte Verstärkung der Glykogenhydrolyse bei O_2-Mangel mit der kürzlich von Bang[4]) beobachteten Vermehrung der Zuckerbildung in der überlebenden Froschleber bei Einwirkung von Narkoticis in Parallele setzen.

Zusammenfassend können wir jedenfalls sagen, daß direkte wie indirekte Untersuchungen ein umfangreiches Tatsachenmaterial zutage gefördert haben, welches das Bestehen enger Beziehungen zwischen den Erscheinungen der Narkose und der Erstickung erweist, und wir wollen jetzt zu der Erörterung der Hypothesen übergehen, die zur Erklärung dieses Zusammenhanges aufgestellt wurden.

2.

Die Feststellung einer Oxydationshemmung durch die Narkotica legt offenbar den Gedanken nahe, daß die Narkose einfach eine Erstickung infolge der Behinderung der Oxydationsprozesse darstellt. Die Diskussion dieser Frage soll erst im nächsten Abschnitte erfolgen, hier sei nur darauf hingewiesen, daß bloß von diesem Gesichtspunkte aus die Frage, auf welche Weise die Oxydationshemmung durch die Narkotica zustande kommt, überhaupt ein besonderes Interesse beansprucht.

---

[1]) H. Nothmann-Zuckerkandl, Die Wirkung der Narkotica auf die Protoplasmaströmung. Diese Zeitschr. **45**, 412, 1912.

[2]) R. Chiari, Beeinflussung der Autolyse durch die Narkotica der Fettreihe. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **60**, 256, 1909.

[3]) E. J. Lesser, Über anoxybiotische Zersetzung des Glykogens. Zeitschr. f. Biol. **53**, 533. — Das Verhalten des Glykogens der Frösche bei Anoxybiose und Restitution, ibid. **56**, 467, 1911; **60**, 388, 1913.

[4]) I. Bang, Die Zuckerbildung der Froschleber. Diese Zeitschr. 49, 40, 1913.

Wenn die Narkose eine Erstickung ist, dann ist mit dem Mechanismus der Oxydationshemmung durch die Narkotica zugleich der Mechanismus der Narkose aufgeklärt. Wenn die Oxydationshemmung dagegen bloß eine Teilerscheinung, eine Folge der Narkose ist, dann ist die Frage nach dem Mechanismus der Oxydationshemmung auch nur ein Teilproblem der Theorie der Narkose.

Verworn[1]) hat als Erster die Oxydationshemmung durch Narkotica zur Grundlage einer allgemeinen Theorie der Narkose gemacht und zu ihrer Erklärung an die von A. v. Baeyer studierte salzartige Vereinigung organischer Sauerstoffverbindungen mit komplexen Säuren angeknüpft, z. B. die Verbindung von Äther mit Ferrocyanwasserstoffsäure, deren Bestand von dem Partialdruck des Äthers abhängt; er dachte sich die Narkose als die Folge einer derartigen Verbindung des Narkoticums mit dem Biogenmolekül. Auch in neuerer Zeit noch hat Verworn[2]) eine solche chemische Blockade O_2-übertragender Gruppen durch die Narkotica als Erklärung angenommen. Bedenkt man aber die außerordentliche Verschiedenheit des chemischen Aufbaues der indifferenten Narkotica, so erscheint der Gedanke, daß sie alle ihre Wirkung durch Bindung bestimmter Stoffe oder Atomgruppen entfalten sollen, chemisch eigentlich gar nicht diskutabel. Von dieser Erwägung aus hatte ich die Hypothese geäußert[3]), daß die Narkotica als Antikatalysatoren oder Paralysatoren (Bredig) der die Oxydation bewirkenden Enzyme fungieren würden, eine Vorstellung, die anscheinend auch Verworn[4]) neuerdings übernommen hat. Das Zustandekommen dieser Antikatalyse wäre damit freilich noch nicht aufgeklärt.

Nun ist in neuerer Zeit von Bürker und von Mansfeld auf zwei verschiedenen Wegen der Versuch einer präziseren Erklärung der Oxydationshemmung durch die Narkotica unternommen worden. Von der Beobachtung ausgehend, daß bei der Elektrolyse Narkotica enthaltender Lösungen eine O_2-Zeh-

---

[1]) M. Verworn, Die Biogenhypothese. Jena 1903. S. 75.

[2]) M. Verworn, Über Narkose. Deutsche med. Wochenschr. 35, 1593, 1909.

[3]) H. Winterstein, Wärmelähmung und Narkose, l. c., S. 346.

[4]) M. Verworn, Narkose. Jena 1912. S. 21.

rung auftritt, deren Intensität einen gewissen Parallelismus zu der Wirkungsstärke des Narkoticums aufweisen würde, und daß Oxydationsprodukte in der Anodenflüssigkeit, bzw. im Anodengas nachweisbar sind, stellte Bürker[1]) die Theorie auf, daß die in den Lipoiden der Zellen sich ansammelnden Narkotica den Sauerstoff zu ihrer eigenen Oxydation mit Beschlag belegen und so die Erstickung der Zelle herbeiführen. Es genügen aber wohl einfache Überlegungen, um die völlige Unhaltbarkeit dieser schon von Höber[2]) treffend kritisierten Hypothese darzutun. Ganz abgesehen davon, daß keine Veranlassung vorliegt, die bei der Elektrolyse beobachteten Erscheinungen mit vitalen Vorgängen in Parallele zu setzen, müßte man nach dieser Theorie erwarten, daß die am leichtesten oxydablen Narkotica die kräftigste Wirkung entfalten. Es ist bekannt, daß dies nicht der Fall ist; daß z. B. der gewöhnliche Alkohol, der im Körper fast völlig oxydiert wird, ein schwaches Narkoticum darstellt, während Äther, Chloroform, Chloralhydrat zu weitaus größtem Teile unzersetzt wieder ausgeschieden werden, andere, wie die Kohlensäure, überhaupt nicht oxydabel sind. Überdies wäre gerade das charakteristischste Kennzeichen der Oxydationshemmung, die Herabsetzung des O_2-Verbrauches in der Narkose, durch diese Theorie gar nicht erklärbar. Denn wenn die Erstickung bloß dadurch zustande kommt, daß der zugeführte Sauerstoff anderweitig verwendet wird, dann wäre zum mindesten keine Herabsetzung, sondern eher sogar eine Steigerung des O_2-Konsums zu erwarten.

Größeren Anklang hat eine von Mansfeld[3]) aufgestellte Hypothese gefunden, obwohl auch hier, wie gleichfalls Höber (l. c.) schon hervorgehoben hat, die theoretischen Grundlagen ganz unrichtig sind. Mansfeld spricht den Lipoiden auf Grund ihres hohen O_2-Absorptionsvermögens eine große Bedeutung für

[1]) K. Bürker, Über eine neue Theorie der Narkose und über die oxydativen Prozesse in der lebenden Substanz. Centralbl. f. Physiol. 24, 103, 1910. — Eine neue Theorie der Narkose. Münchner med. Wochenschr. 1910, Nr. 27.

[2]) R. Höber, Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 3. Aufl. Leipzig 1911. S. 220.

[3]) G. Mansfeld, Narkose und Sauerstoffmangel. 1. Mitt. Arch. f. d. ges. Physiol. 129, 69, 1909.

die O_2-Versorgung der Zellen zu und argumentiert weiter: „Die Physik lehrt uns, daß jede Lösung weniger Gase absorbiert als das Lösungsmittel selbst." „Die Narkose wäre demnach eine partielle Sauerstoffarmut der Nervenzellen, verursacht dadurch, daß dieselben den ihnen zu Gebote stehenden Sauerstoff nur in unzureichender Weise aufnehmen können."

Demgegenüber muß darauf hingewiesen werden, daß eine stärkere Beeinflussung der Löslichkeit bisher nur von Elektrolyten bekannt ist, deren Verhalten eine nicht zu verallgemeinernde Besonderheit darstellt, während, wie Höber hervorhebt, die Anwendung des Henry-Daltonschen Gesetzes auf verdünnte Lösungen aller Stoffe gerade umgekehrt erwarten läßt, daß zwei in Lösung befindliche Stoffe einander nicht beeinflussen. Tatsächlich hat Jahn (mitgeteilt von Roth[1]) auf Grund theoretischer Betrachtungen das Gesetz abgeleitet, daß in verdünnten Lösungen indifferenter Substanzen die molekulare Konzentration eines Gases unter sonst gleichen Bedingungen die gleiche sein muß wie in reinem Wasser, und Roth (l. c.) hat diese Theorie durch Untersuchung der Löslichkeit von Stickoxydul in Lösungen, die unter anderem bis zu 6% Harnstoff enthielten, völlig bestätigt gefunden. Ja, Knopp[2]) fand — entgegen dem theoretisch zu erwartenden — dieses Gesetz für die Löslichkeit von Wasserstoff selbst in konzentrierten Lösungen von Chloralhydrat gültig.

Wenn Nichtelektrolyte, zumal in starken Konzentrationen, die Löslichkeit gleichfalls in geringem Grade beeinflussen, so liegt dies, abgesehen von den Fällen von Hydratbildung, nach Philip[3]) hauptsächlich wohl daran, daß die Volumeinheit einer Lösung nicht das gleiche, sondern ein geringeres Wasservolumen enthält, welches für die Gasabsorption maßgebend ist, da der gelöste Stoff als solcher sich meist nicht (oder nur wenig) an der Absorption beteiligt; daher ist die Löslichkeitsverminderung

---

1) W. Roth, Über die Absorption des Stickoxyduls in wässerigen Lösungen verschieden dissoziierter Stoffe. Zeitschr. f. physikal. Chem. 24, 114, 1897.

2) W. Knopp, Über die Löslichkeitsbeeinflussung von Wasserstoff und Stickoxydul usw. Zeitschr. f. physikal. Chem. 48, 97, 1904.

3) J. Ch. Philip, Influence of non-electrolytes and electrolytes on the solubility etc. Chem. Soc. London 1907; ref. in: Fortschr. d. Physik 63, I, 421, 1907.

auch meist proportional der Konzentration des gelösten Stoffes (vgl. Geffken[1]), Usher[2]), Drucker und Moles[3]). Die Kolloide vollends beeinflussen, wie Geffken[1]) für anorganische Kolloide festgestellt hat, und wie aus der geringen Differenz der Absorptionskoeffizienten von Blutserum und Wasser hervorgeht, das Lösungsvermögen des letzteren nur sehr wenig. Nach Bohr[4]) beträgt der Absorptionskoeffizient von Serum für Sauerstoff ca. 97,5 % desjenigen für Wasser. Von dieser geringfügigen Verminderung fällt natürlich der größte Teil auf Kosten der Salze. Eine 10 %ige Albumosenlösung vermindert den Absorptionskoeffizienten nur um ca. 5 %.

Was nun speziell die Narkotica anlangt, so erscheint die Annahme einer Herabsetzung des Absorptionsvermögens von vornherein ausgeschlossen für die gasförmigen Narkotica wie Kohlensäure, wo eine solche Annahme dem Henry-Daltonschen Gesetz direkt widersprechen würde; sie ist ferner unwahrscheinlich für den Äthylalkohol, der, wie bereits vor vielen Jahren Carius[5]) gezeigt hat, selbst ein viel größeres Gaslösungsvermögen besitzt (so ist sein Absorptionskoeffizient für Sauerstoff bei 0° mehr als fünfmal so groß wie der des Wassers). Für Chloralhydrat fand, wie schon erwähnt, Knopp (l. c.), daß es selbst in starken Konzentrationen die Löslichkeit der Gase im Wasser nicht herabsetzt, und in gleicher Weise sahen Moore und Roaf[6]) das Gasabsorptionsvermögen von Blutserum und Hämoglobinlösungen durch Zusatz von Chloroform keine Verminderung erfahren.

---

[1]) G. Geffken, Beiträge zur Kenntnis der Löslichkeitsbeeinflussung. Zeitschr. f. physikal. Chem. **49**, 257, 1904.

[2]) F. L. Usher, The influence of non-electrolytes on the solubility etc. Journ. Chem. Soc. **97**, 66, 1910; ref. in: Fortschr. d. Physik **66**, I, 273, 1910.

[3]) K. Drucker und E. Moles, Gaslöslichkeit in wässerigen Lösungen von Glycerin und Isobuttersäure. Zeitschr. f. physikal. Chem. **75**, 405, 1910.

[4]) Chr. Bohr, Absorptionskoeffizienten des Blutes und des Blutplasmas für Gase. Skand. Arch. f. Physiol. **17**, 104, 1905.

[5]) L. Carius, Absorptiometrische Untersuchungen. Ann. d. Chem. u. Pharm. **94**, 129, 1855.

[6]) B. Moore and E. Roaf, On certain physical and chemical properties of solutions of chloroform etc. (Prelim. Comm.). Proc. Roy. Soc. London (B) **73**, 382, 1904.

Wie man sieht, boten die bis dahin vorliegenden Daten keine Grundlage für die Mansfeldsche Hypothese. Auch Mansfeld selbst hat diese durch keinerlei Argumente gestützt, denn seine schon im vorangehenden Abschnitt zitierten Versuche haben lediglich das vorhandene umfangreiche Tatsachenmaterial über Analogien zwischen den Erscheinungen der Erstickung und der Narkose um einige Beispiele bereichert, die über den Mechanismus der Oxydationshemmung nicht das Geringste aussagen. Nun hat aber kürzlich auf Anregung von Mansfeld Frl. Hamburger[1]) direkte Untersuchungen über den Einfluß von Narkoticis auf das Gasabsorptionsvermögen von Lipoiden mitgeteilt, deren Resultate nicht bloß die Vorstellungen von Mansfeld zum Teil in überraschender Weise zu stützen scheinen, sondern an sich so erstaunlich sind, daß sie zu einer Nachprüfung geradezu herausfordern. Hamburger untersuchte die Löslichkeit von Sauerstoff in Olivenöl vor und nach Zusatz verschiedener Narkotica und fand, daß ein solcher Zusatz schon in geringen Mengen eine Abnahme der Löslichkeit herbeiführt, die von einigen Prozent bis zu mehr als 50% des Wertes betragen konnte!! Wenn man bedenkt, daß nach Bohr (l. c.) ein Zusatz von 10% Rohrzucker die O_2-Absorption in Wasser nur um etwa 7% vermindert, dann müßte eine Abnahme der Löslichkeit um 51,9%, wie sie Hamburger in einem Falle bei Zusatz von 0,8% Sulfonal beobachtet haben will, geradezu als ein physikalisches Wunder erscheinen! Immerhin, es könnte auch solche Wunder geben. Aber der Glaube hieran wird stark erschüttert, wenn man die von der Verfasserin erhaltenen Werte untereinander vergleicht. Einmal ist keinerlei Beziehung zwischen der Konzentration des Narkoticums und der Löslichkeitsabnahme zu beobachten (so soll z. B. eine 2,5%ige und eine 5%ige Lösung von Monochlorhydrin die gleiche Verminderung der Gasabsorption herbeiführen), vor allem aber sind die unter ganz gleichen Bedingungen erhaltenen Resultate ganz verschieden: die gleiche Sättigung mit Trional soll in dem gleichen Öl einmal eine Löslichkeitsabnahme von 37,5%, ein andermal von 50,0% hervorrufen, der gleiche Zusatz von 0,8% Sulfonal soll in drei mit dem gleichen Öl an-

[1]) E. Hamburger, Narkose und Sauerstoffmangel. 4. Mitt. Arch. f. d. ges. Physiol. **143**, 186, 1912.

gestellten Versuchen eine Löslichkeitsabnahme von 35,3, 41,9 und 51,9 $^{0}/_{0}$ erzeugen, was Differenzen in der O_2-Aufnahme bis zu 27 $^{0}/_{0}$ entsprechen würde!! Die Verfasser haben offenbar nicht bedacht, daß es sich hier doch um physikalische Gesetze handelt, die keine „individuellen Schwankungen" kennen, sonst hätten sie solche „Versuchsergebnisse" wohl nicht veröffentlicht.

Wenn nun auch an der Fehlerhaftigkeit dieser Versuche von vornherein nicht zu zweifeln war, so schien es doch untersuchenswert, ob hier überhaupt eine für die Theorie der Narkose verwertbare Erscheinung vorliegt. Hamburger hat bei ihren Versuchen die O_2-Aufnahme gasfreien Öles durch Absorptionsanalyse zu ermitteln gesucht; da eine exakte Durchführung dieses Verfahrens in Wahrheit mit sehr großen Schwierigkeiten verbunden ist[1]), habe ich den einfacheren und sichereren Weg eingeschlagen, das Öl vor und nach Zusatz des Narkoticums mit Luft zu sättigen und, durch Evakuieren, auf gasanalytischem Wege die Menge der absorbierten Gase festzustellen.

[1]) Auf welche Weise Hamburger zu ihren absurden Resultaten gelangt ist, läßt sich bei den überaus dürftigen Angaben über die verwendete Methodik, die sich im wesentlichen auf einen Hinweis auf Ostwald-Luthers „Physiko-chemische Messungen" beschränken, mit Sicherheit natürlich nicht angeben. Die Absorptionsanalyse, wie sie Hamburger verwendete, hat zur Voraussetzung die absolute Gasfreiheit der auf ihr Absorptionsvermögen zu untersuchenden Flüssigkeit. Nun gibt die Verfasserin zwar an, daß „das Öl zuerst im Vakuum durch Schütteln von seinem Gasinhalt befreit wurde", aber es wird nicht gesagt, auf welche Weise dieses Vakuum erzeugt war, noch auch, ob und wie sie sich von der Gasfreiheit des Öles überzeugte. Es wird ferner angegeben, daß die Überführung des Öles in das Absorptionsgefäß unter Stickstoffdruck erfolgte. Daraus geht augenscheinlich hervor, daß die Verfasserin glaubte, ein Gehalt an Stickstoff sei für die Absorptionsanalyse von Sauerstoff belanglos. Die Unrichtigkeit dieser Annahme liegt auf der Hand: denn bei der Absorptionsanalyse erfolgte keine direkte Bestimmung des aufgenommenen Sauerstoffes, sondern dieser wurde bloß aus der beim Sättigen des Öles mit reinem Sauerstoff eintretenden Volumverminderung berechnet. Aber wenn eine N-haltige Flüssigkeit mit reinem Sauerstoff geschüttelt wird, so erfolgt eine Abgabe von Stickstoff bis zum Ausgleich des Partiardruckes, und dieser abgegebene Stickstoff wird das Volumen des aufgenommenen Sauerstoffs kleiner erscheinen lassen, als es tatsächlich war. Auf Grund aller dieser Angaben vermute ich, daß das verwendete Öl einfach noch einen nicht unbeträchtlichen Gehalt an

Die Sättigung des Öles mit Luft erfolgte nach dem einfachen, schon in früheren Versuchen[1]) von mir verwendeten Verfahren, bei dem die zu sättigende Flüssigkeit in einen Glaskolben gebracht wird, der horizontal an einer Drehscheibe befestigt und durch einen Elektromotor in ziemlich rasche Umdrehung versetzt wird. Um eine zufällige Übersättigung mit Luft auszuschließen, wurden alle Ölproben nach Auflösen des Narkoticums und eventuellem Abfiltrieren vorsichtshalber zuerst mit der Wasserstrahlpumpe leicht ausgepumpt, um ihren Gasdruck mit Sicherheit unter den der Luft herabzudrücken, und hierauf 1 Stunde lang im Drehapparate mit Luft gesättigt. Je 50 ccm wurden dann in das Vakuum der Quecksilberpumpe überführt, unter Erwärmen und Schütteln ausgepumpt und die Gase in einen Pettersonschen Analysenapparat, dessen capillare Meßbürette in 0,01 ccm geteilt war, analysiert. Zur Absorption des Sauerstoffs diente nach den Vorschriften Durigs[2]) hergestellte alkalische Natriumhydrosulfitlösung. Der geringe Kohlensäuregehalt wurde im allgemeinen nicht gesondert bestimmt. Zu den Versuchen wurde reines Olivenöl verwendet und der Einfluß eines Zusatzes von Sulfonal, Phenylurethan und Alkohol untersucht, der letztere in 10%iger, die beiden ersteren in gesättigter Lösung. Hierbei konnten die von Hamburger angegebenen Konzentrationen von 0,8% Sulfonal und 5% Phenylurethan jedoch nicht ganz erreicht werden, da von den in diesem Verhältnis zugesetzten Substanzen ein Teil dauernd ungelöst blieb. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Gasen, insbesondere an Stickstoff aufwies, und zwar wohl um so mehr, je gründlicher es behufs Auflösung der zugesetzten Substanzen vor dem Versuch geschüttelt worden war. So würde sich in einfacher Weise erklären, warum jeder Zusatz einer Substanz eine scheinbare Herabsetzung des Sauerstoffaufnahmevermögens herbeiführte, und warum gerade die am schwersten löslichen Substanzen, wie Sulfonal und Trional, bei deren Zusatz das Öl wohl auch am heftigsten durchgeschüttelt und daher auch am schlechtesten entgast worden war, die größte Abnahme der Gaslöslichkeit bewirkt haben sollen.

[1]) H. Winterstein, Zur Kenntnis der Blutgase wirbelloser Seetiere. Diese Zeitschr. 19, 384, 1909.

[2]) A. Durig, Zur biochemischen Methodik. Zeitschr. f. biol. Technik u. Meth. 2, 158, 1912.

50 ccm bei 17 bis 18° mit Luft gesättigten Öles enthalten Kubikzentimeter Gas (reduziert auf 0° und 760 mm Hg)

Lösung	O_2 (+ CO_2)	N_2 (+ A usw.)
Öl ohne Zusatz	1,26	2,53
„ „ „ [1]	1,26	2,51
„ mit Sulfonal gesättigt	1,29	2,58
„ „ „ „	1,24	2,50
„ „ Phenylurethan gesättigt	1,26	2,53
„ „ 10% Äthylalkohol	1,33	2,68

Diese Versuche zeigen auf das allerdeutlichste, daß auch nicht eine Spur des von Mansfeld und Hamburger behaupteten Einflusses der Narkotica auf das Sauerstoffabsorptionsvermögen der Lipoide vorhanden ist. Nur der Alkohol zeigt eine leichte Beeinflussung der Gasabsorption, aber gerade in einem der Mansfeldschen Hypothese entgegengesetzten Sinne, indem das Absorptionsvermögen eine geringfügige Steigerung erfährt, die aus der hohen Löslichkeit der Gase in Alkohol (s. o.) ohne weiteres zu erklären ist. Damit ist der Mansfeldschen Hypothese über die Ursache der Oxydationshemmung durch die Narkotica jede Grundlage entzogen.

Mit der Mansfeldschen Theorie fällt wohl auch die von Breslauer und Woker[2]) geäußerte Hypothese, daß bei der Narkose infolge der geringen Löslichkeit des Narkoticums im Protoplasmakörper an der Berührungsfläche zwischen diesem und der lipoiden Plasmahaut eine Entmischung stattfinde, die zur Bildung eines feinen Narkoticumhäutchens führe, durch das der Zutritt von Sauerstoff verhindert würde. Es ist überdies zu bemerken, daß die Annahme der Entstehung eines solchen

[1]) In diesem Versuche wurde auch der CO_2-Gehalt gesondert bestimmt; der hieraus berechnete Gasgehalt des Olivenöls in Vol.-%: 2,39 O_2, 5,02 N_2, 0,12 CO_2 stimmt mit den von Vernon (The solubility of air in fats etc. Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, 79, 366, 1906) in einer größeren Zahl von Versuchen erhaltenen Mittelwerten: 2,28 O_2, 5,26 N_2, 0,20 CO_2 gut überein, ein Zeichen, daß, im Gegensatz zu Hamburgers Angaben, die verschiedenen Öle sich nicht nennenswert durch ihr Absorptionsvermögen für Gase unterscheiden.

[2]) A. Breslauer und G. Woker, Über die Wirkung von Narkoticakombinationen auf Colpidium colpoda. Zeitschr. f. allg. Physiol. 13, 282, 1912.

Häutchens physikalisch unbegründet erschiene. Denn selbst wenn die Lipoide ausschließlich auf die äußere Grenzschicht beschränkt und der Protoplasmakörper nicht lipoidreicher wäre als das die Zellen umspülende Medium, welches das Narkoticum zuführt, so könnte an der Innenseite der Plasmahaut eben nur eine dem Teilungsgesetz entsprechende Abgabe des Narkoticums bis zu der auch an ihrer Außenfläche herrschenden Konzentration, nicht aber eine Entmischung und Ausscheidung des Narkoticums erfolgen.

Schließlich muß erwähnt werden, daß kürzlich Meyerhof[1]) an Seeigeleiern unter Verwendung von Rongalitweiß als Indicator direkt nachweisen konnte, daß bei einer Narkose durch Phenylurethan, bei der die O_2-Atmung etwa auf die Hälfte herabgesetzt war, das Eindiffundieren des Sauerstoffs in die Zellen mit der gleichen Schnelligkeit erfolgte wie in normalem Seewasser.

Fassen wir die Resultate der vorangehenden Ausführungen zusammen, so müssen wir sagen, daß die bisher zur Erklärung der Oxydationshemmung durch die Narkotica aufgestellten Hypothesen durchaus unzureichend sind, zum Teil, wie die von Bürker und Mansfeld, mit den Tatsachen in direktem Widerspruch stehen. Schon eingangs dieses Abschnittes wurde betont, daß ein besonderes Interesse, gerade den Mechanismus der Oxydationshemmung aufzudecken, vor allem dann besteht, wenn man diese für die eigentliche Ursache der Narkose überhaupt ansieht. Wir müssen daher nun zunächst die Frage untersuchen, ob eine Zurückführung der Narkose auf Behinderung der Oxydationsprozesse überhaupt möglich ist.

3.

Wer die in der Narkose zu beobachtende Oxydationshemmung als die eigentliche Ursache der Narkoselähmung überhaupt betrachtet, muß notwendigerweise von zwei Voraussetzungen ausgehen: 1. daß diese Oxydationsprozesse stets zuerst oder ausschließlich durch die Narkose beeinflußt werden,

[1]) O. Meyerhof, Über scheinbare Atmung abgetöteter Zellen durch Farbstoffreduktion. Arch. f. d. ges. Physiol. **149**, 250, 1812.

und 2. daß alle durch die Narkose beeinflußbaren Lebensvorgänge auf Oxydationsprozessen beruhen.

Betrachten wir zunächst die erste Voraussetzung, so kennen wir verschiedene Tatsachen, die augenscheinlich in Widerspruch mit ihr stehen. Schon Cl. Bernard[1]) hat beobachtet, daß durch Äther eine Hemmung der Keimung von Samen bei einer Konzentration bewirkt wird, bei der die CO_2-Ausscheidung (gemessen durch den Barytniederschlag) anscheinend unverändert bleibt, und hat geradezu angenommen, daß die „chemischen Erscheinungen der Destruktion", als welche er den Atmungsvorgang auffaßt, durch die Narkose nicht gehemmt würden. Ebenso beobachtete er unter dem Einfluß von Chloroform eine Hemmung der assimilatorischen O_2-Abgabe durch die Chlorophylltätigkeit bei Fortgang der CO_2-Ausscheidung, und glaubte, daß auf diese Weise eine Trennung der assimilatorischen und respiratorischen Funktion der Pflanzen möglich sei. In völliger Übereinstimmung mit der erstgenannten Beobachtung steht die neuerdings von Warburg[2]) festgestellte Tatsache, daß durch Zusatz von Phenylurethan in einer Konzentration, welche die Oxydationsprozesse nur geringfügig herabsetzt, Zell- und Kernteilung befruchteter Eier weitgehend unterdrückt werden kann. Vernon[3]) fand die oxydationshemmende bzw. oxydasezerstörende Narkosekonzentration in seinen früher erwähnten Versuchen um das Vielfache höher als die zur Narkose erforderliche. Rhode[4]) sah unter dem Einfluß lähmender Gifte (darunter Chloralhydrat) die Tätigkeit des Herzens stets stärker absinken als seinen Sauerstoffverbrauch. — Für die Auffassung, daß die Narkose nicht durch die Oxydationshemmung bewirkt werde, sondern zwei voneinander unabhängige Beeinflussungen vorliegen, würden nach Warburg[5]) insbesondere die über seine Anregung angestellten Versuche von Usui[6]) sprechen, aus denen hervorgeht,

---

[1]) Cl. Bernard, Leçons sur le phénomènes de la vie 1, 7. Leçon. Paris 1885.

[2]) O. Warburg, Über die Oxydationen in lebenden Zellen nach Versuchen am Seeigelei. Zeitschr. f. physiol. Chem. 66, 305, 1910.

[3]) H. M. Vernon, vgl. S. 149.

[4]) E. Rhode, vgl. S. 149.

[5]) O. Warburg, Untersuchungen über die Oxydationsprozesse in Zellen. Münch. med. Wochenschr. 58, 289, 1911.

[6]) R. Usui, vgl. S. 149.

daß die Oxydationsprozesse im Zentralnervensystem gegen Narkose nicht empfindlicher sind als die anderer Zellen, wie dies auf Grund der leichteren Narkotisierbarkeit des Zentralnervensystems zu erwarten wäre. Dieser Einwand gegen die Erstickungstheorie der Narkose erscheint aber wenig beweiskräftig, da eine gleich große Behinderung der Oxydationsprozesse einen sehr verschiedenen Einfluß auf die Organfunktionen ausüben kann. Tatsächlich wissen wir ja, daß das Zentralnervensystem gegen Sauerstoffmangel empfindlicher ist als alle anderen Organe, und daher durch eine viel geringere Oxydationshemmung bereits außer Funktion gesetzt werden muß.

Von viel größerer Bedeutung aber als diese mehr indirekten Argumente wäre offenbar die Beobachtung einer narkotischen Lähmung nachweislich anoxybiotischer Vorgänge oder gar anoxybiotisch lebender Organismen. Denn es liegt auf der Hand, daß mit einem solchen Nachweis der Erstickungstheorie der Narkose jede Grundlage entzogen wäre.

Auf den ersten Blick schiene es, als bedürfte es eines solchen Nachweises gar nicht erst, weil schon längst bekannt ist, daß die Narkose viel rascher eine Lähmung des Organismus herbeiführt als die Entziehung des Sauerstoffes. Aber dieser naheliegende Einwand ist, wie schon Verworn[1]) hervorhebt, natürlich nicht entscheidend, weil die Narkose die Oxydationsprozesse direkt und unmittelbar hemmt, während die O_2-Entziehung bloß die Zufuhr weiteren Sauerstoffs verhindert, nicht aber die Verwertung des im Organismus noch vorhandenen. Die Narkose muß mithin eine akute, die O_2-Entziehung dagegen nur eine — je nach dem vorhandenen Sauerstoffvorrat — mehr oder minder langsame Erstickung erzeugen. Mithin läuft die Entscheidung auf das grundlegende Problem hinaus, ob die in einem O_2-freien Medium zu beobachtende Lebenstätigkeit durch aufgespeicherten Sauerstoff oder durch anoxybiotische Vorgänge ermöglicht wird, und die ganze Erstickungstheorie der Narkose steht und fällt mit der von der Verwornschen Schule gemachten Annahme eines Sauerstoffvorrates in den verschiedenen Geweben, eine Annahme, von der auch ich bei meinen früher erwähnten Versuchen über Wärmelähmung und Narkose ausgegangen war. Nun habe ich selbst aber später durch Gaswechselversuche am

[1]) Verworn, Narkose. Jena 1912. S. 16.

isolierten Froschrückenmark den direkten Nachweis geführt[1]), daß irgendwelche „Sauerstoffdepots“, für deren Existenz gerade hier besonders zahlreiche Argumente zu sprechen schienen, nicht vorhanden sind und daß das längere Überleben in einem O_2-freien Medium daher nur auf anoxybiotischen Vorgängen beruhen könne. Das gleiche ergibt sich indirekt aus dem von Lesser[2]) mit calorimetrischer Methodik geführten Nachweis, daß in einem O_2-freien Medium die Wärmeproduktion von Fröschen so stark absinkt, daß deren Ursprung nicht in Oxydationsprozessen gesucht werden kann. Nothmann-Zuckerkandl[3]) hat kürzlich darauf hingewiesen, daß die Protoplasmaströmung von Nitella, die nach Versuchen von Kühne erst nach wochenlangem O_2-Mangel zum Stillstand kommt, durch die Narkose ebenso rasch gehemmt wird wie bei anderen Pflanzen. Warburg und Wiesel[4]) haben neuerdings gezeigt, daß die Vermehrung der Hefezellen, bei denen die Unabhängigkeit der Lebenstätigkeit von der Sauerstoffatmung ja längst erwiesen ist, bei O_2-Abschluß durch die Narkotica entsprechend dem Gesetz der homologen Reihen gehemmt wird, und daß die gleiche hemmende Wirkung auch an der Preßsaftgärung zu beobachten ist.

Zur Ergänzung dieses Tatsachenmaterials habe ich einige Versuche an tierischen Organismen ausgeführt, die normalerweise dauernd anoxybiotisch leben und bei denen die Annahme eines O_2-Vorrates daher völlig sinnlos wäre, nämlich den Askariden.

In einem Versuche wurden 6 Spulwurmweibchen (Ascaris lumbricoides vom Schwein) in eine Kochsalzlösung, die 5% Alkohol enthielt, gebracht; nach $^1/_4$ Stunde waren die Bewegungen bei allen abgeschwächt, nach 1 Stunde alle bis auf einen bewegungslos. In normaler Lösung kehrten im Verlaufe von $^3/_4$ Stunden bei allen die Bewegungen wieder zurück.

---

[1]) Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 314, 1907.

[2]) E. F. Lesser, Die Wärmeabgabe der Frösche in Luft und in sauerstofffreien Medien. Zeitschr. f. Biol. 51, 287.

[3]) H. Nothmann-Zuckerkandl, vgl. 153.

[4]) O. Warburg und R. Wiesel, Über die Wirkung von Substanzen homologer Reihen auf Lebensvorgänge. Arch. f. d. ges. Physiol. 144, 465, 1912.

In einem weiteren Versuche wurden 6 Spulwürmer (3 ♂ und 3 ♀) in mit Chloroform geschüttelte Salzlösung gebracht. Nach 20 Minuten waren alle bewegungslos; auch hier konnten in frischer Lösung alle bis auf einen zum Leben zurückgerufen werden.

Diese Versuche zeigen, daß anoxybiotische Organismen ebensogut narkotisierbar sind wie oxybiotische; die gleiche Alkoholkonzentration von 5 %, die bei direkter Einspülung Narkose des Zentralnervensystems beim Frosch oder des Säugetierherzens erzeugt, führt auch hier zur Bewegungslähmung. Der langsame Eintritt der Narkose wie auch der Erholung findet in der Erschwerung der Diffusion durch die dicke Kutikularsubstanz seine selbstverständliche Erklärung.

Die fakultativen Anoxybionten sind offenbar ein vorzügliches Versuchsobjekt, um den Einfluß der Narkose auf oxybiotische und anoxybiotische Stoffwechselvorgänge gesondert zu untersuchen, und ich hoffe in einer späteren Mitteilung weiteres hierüber berichten zu können.

Für jetzt genügt die durch alle oben angeführten Beobachtungen sichergestellte Tatsache, daß die narkotische Lähmung nicht an den Ablauf von Oxydationsprozessen geknüpft ist, und die Narkose daher unmöglich einfach auf eine Oxydationshemmung zurückgeführt werden kann.

4.

Diese Erkenntnis führt wohl ohne weiteres zu der Schlußfolgerung, daß die Oxydationshemmung in der Narkose nur einen Teil des viel allgemeineren Problems der Narkose überhaupt darstellt, etwa so wie auch die Hemmung der assimilatorischen Tätigkeit des Chlorophylls, der Wachstumsvorgänge, der Erregungsleitung usw. In der Tat ist ja die Narkose, wie Cl. Bernhard (l. c.) zuerst gezeigt hat, ein im wahrsten Sinne des Wortes „allgemein physiologischer Vorgang“, von dem bis jetzt keine Ausnahme bekannt geworden ist, während die Erscheinungen der Asphyxie durch O_2-Mangel, so verbreitet sie auch sein mögen, doch auf den Kreis der oxybiotischen Organismen beschränkt sind.

Es ist nicht beabsichtigt, im folgenden die verschiedenen Narkosetheorien einer Diskussion zu unterziehen; nur jene

neueren Vorstellungen sollen kurz erörtert werden, die vielleicht auch für eine Erklärung der Beziehungen der Narkose zu den Oxydationsprozessen als Grundlage dienen können. Daß die durch ein großes Tatsachenmaterial gestützte Theorie von Meyer und Overton, nach der die Wirksamkeit der indifferenten Narkotica durch den Teilungskoeffizienten zwischen Lipoiden und Wasser bestimmt wird, an sich noch keine Theorie der Narkose bedeutet, wurde von den verschiedensten Seiten schon oft hervorgehoben. In neuerer Zeit ist aber mehrfach versucht worden, sie zu einer tatsächlichen Theorie über den Mechanismus der Narkose zu erweitern, indem ganz bestimmte Vorstellungen über die durch die Narkotica bewirkten Veränderungen der Zellipoide und die hierdurch hervorgerufenen Störungen der cellularen Vorgänge geäußert wurden, Vorstellungen, deren noch unzureichende experimentelle Begründung freilich am deutlichsten durch die Tatsache veranschaulicht wird, daß sie sich zum Teil gerade in entgegengesetzter Richtung bewegen.

Denn während Meyer[1]) in einem geistvollen Vortrage über die Bedeutung der Zellipoide die Anschauung geäußert hat, daß die Narkotica durch ihre lipoidlösende Wirkung eine Beseitigung oder doch Auflockerung der feinen Lipoidhäutchen bewirken, die einmal als Schutzhülle die äußere Oberfläche der Zelle, dann aber auch im Innern die einzelnen Alveolen des schaumförmig strukturierten Protoplasmas gegeneinander abgrenzen, und geneigt ist, in der hierdurch bedingten Vermehrung der „normalbegrenzten Ionenpermeabilität" das Wesen der Narkose zu sehen, kamen Höber[2]) und nach ihm Lillie[3]) auf Grund ihrer Beobachtungen über die hemmende Wirkung der Narkotica auf die durch Salzapplikation hervor-

[1]) H. H. Meyer, Über die Beziehung zwischen den Lipoiden und pharmakologischer Wirkung. Münch. med. Wochenschr. 56, 1577, 1909.

[2]) R. Höber, Beiträge zur physikalischen Chemie der Erregung und der Narkose. Arch. f. d. ges. Physiol. 120, 492, 1907. — Die physikalisch-chemischen Vorgänge bei der Erregung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 10, 173, 1910 (Sammelreferat). — Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 3. Aufl. Leipzig 1911. S. 488f.

[3]) R. S. Lillie, On the connection between changes of permeability and stimulation etc. Amer. Journ. of Physiol. 24, 14, 1909. — Antagonism between salts and anaesthetics I. Ibidem 29, 372, 1912.

zurufenden Erscheinungen gerade zu der entgegengesetzten Vorstellung, nach der die Narkose in einer Verminderung der Permeabilität der Lipoidmembran bestehen würde.

Von dieser Anschauung aus hat Lillie (l. c.) auch die Oxydationshemmung in der Narkose auf verschiedene, freilich sicher unzutreffende Weise zu erklären getrachtet. In seiner ersten Mitteilung suchte er die Beeinflussung der Oxydationsprozesse durch die Permeabilität der Zellmembran auf den wechselnden CO_2-Druck im Zellinnern zurückzuführen, indem eine der Reizung zugrunde liegende Steigerung der Zellpermeabilität zu erhöhtem Herausdiffundieren der Kohlensäure und so nach dem Massenwirkungsgesetz durch Beseitigung des Reaktionsproduktes zu einer Steigerung der die CO_2-Bildung bewirkenden Oxydationsvorgänge führen würde, während eine Verminderung der Permeabilität den entgegengesetzten Erfolg nach sich zöge. Dieser Annahme steht aber die große Diffusionsgeschwindigkeit der Kohlensäure entgegen, ebenso wie die schon von Warburg[1]) hervorgehobene weitgehende Unabhängigkeit der Oxydationsprozesse von der CO_2-Tension. Ebenso unzutreffend ist die in der zweiten Arbeit versuchte Zurückführung der Oxydationshemmung in der Narkose auf das primäre Ausbleiben der den O_2-Verbrauch bedingenden Erregungsvorgänge, da, wie aus den früher zitierten Versuchen ja hervorgeht, diese Hemmung auch nach vorangegangener Erstickung, also bei maximalem O_2-Bedarf, feststellbar ist.

Vernon[2]) schloß aus der Beobachtung, daß die Konzentration, in der die Narkotica die Wirkung der Indophenoloxydase zu hemmen beginnen, nur wenig höher liegt als die, in der sie Erythrocyten lackfarbig machen, auf eine Abhängigkeit der Hemmungswirkung von Lipoiden, vielleicht von Lipoidmembranen, welche die Gewebsoxygenase und Peroxydase zusammenhalten und ihre gemeinsame enzymatische Tätigkeit ermöglichen. Diese Vorstellung ließe sich unschwer mit der Meyerschen Theorie der Narkose in Einklang bringen, aber offenbar auch ebenso leicht dahin modifizieren, daß eine durch

[1]) O. Warburg, Über die Oxydationen in lebenden Zellen usw. Zeitschr. f. physiol. Chem. 66, 305, 1910.

[2]) H. M. Vernon, Die Abhängigkeit der Oxydasewirkung von Lipoiden. Diese Zeitschr. 47, 374, 1912.

die Narkose bewirkte Verdichtung von Lipoidmembranen ein für den Ablauf der Oxydationsprozesse erforderliches Zusammenwirken verschiedener Enzyme unmöglich macht.

Warburg und Wiesel[1]) haben beobachtet, daß für die Wirksamkeit der Narkotica das Gesetz der homologen Reihen auch bei der Hemmung der Gärung von „Acetondauerhefe“ gilt, bei der die Lipoide sicher größtenteils ausgelaugt sind, eine sehr bemerkenswerte Entdeckung, die darauf hinweist, daß mit der Lipoidtheorie überhaupt das letzte Wort noch lange nicht gesprochen ist. Sie haben ferner die für die Theorie der Narkose vielleicht gleichfalls sehr bedeutungsvolle Tatsache aufgedeckt, daß die hemmende Wirkung der Narkotica auf die Gärkraft ebenso wie auf die Oxydationsprozesse in auffälliger Weise ihrer Fähigkeit parallel geht, in Hefepreßsaft Niederschläge hervorzurufen, und Warburg[2]) ist daher geneigt, die Wirkung der Narkose auf die Atmung in der Ausflockung oder doch Verminderung des Dispersionsgrades eines Atmungsenzyms zu suchen, das normalerweise in großer Oberflächenentwicklung an den Zellmembranen adsorbiert wäre.

Diese verschiedenen Hypothesen zeigen, so widersprechend sie auch sein mögen, jedenfalls, daß eine Aufdeckung der der Narkose überhaupt zugrunde liegenden physikalisch-chemischen Vorgänge wohl auch auf die Teilerscheinung der Oxydationshemmung ein Licht zu werfen vermöchte. Damit wäre aber noch nicht die auffallende Übereinstimmung erklärt, die, wie eingangs erörtert, die Erscheinungen der Narkose und der Asphyxie aufweisen, und die auf einen innigen Zusammenhang beider hindeuten. Die bisherigen Theorien haben diesen Zusammenhang durch Zurückführung der Narkose auf eine akute Erstickung infolge der Oxydationshemmung zu erklären versucht; dieser Versuch ist, in seiner Allgemeinheit zum mindesten, mißglückt. Eine solche Deutung könnte höchstens für die von dem Ablauf von Oxydationsprozessen so hochgradig abhängigen Lebensvorgänge der Warmblüter mit in Betracht kommen, nicht aber für jene der Kaltblüter, die durchwegs zu mehr

---

[1]) Warburg und Wiesel, vgl. 165.

[2]) O. Warburg, Untersuchungen über die Oxydationsprozesse in Zellen. II. Münch. med. Wochenschr. **59**, 2550, 1912.

oder minder langer Anoxybiose befähigt zu sein scheinen Wenn nun, wie wir gesehen haben, die Narkose den allgemeineren Vorgang darstellt, so drängt sich der Gedanke auf, ob nicht vielleicht der umgekehrte Weg gangbar wäre, die bei O_2-Mangel zu beobachtenden Erscheinungen auf die allgemeineren der Narkose zurückzuführen. Eine solche Annahme läge nicht außerhalb des Bereiches der Möglichkeit. Wir wissen, daß die asphyktischen Erscheinungen der Hauptsache nach durch „Erstickungsstoffe" bedingt werden, d. h. durch Stoffe, die infolge des O_2-Mangels entweder entstehen oder doch in abnormer Weise sich anhäufen. Unter diesen Stoffen könnten sich sehr wohl auch solche befinden, die in ähnlicher Weise wie die Narkotica die Zellvorgänge beeinflussen. Kennen wir doch in der Kohlensäure bereits ein Beispiel eines in großer Menge narkotisch wirkenden Stoffwechselproduktes. — Vielleicht werden sich Wege finden, experimentell diese Hypothese weiter zu verfolgen, die zu der Anschauung Cl. Bernards[1]) zurückführt, daß die durch die verschiedenen Faktoren, wie Gifte, Wärme, Asphyxie usw. erzeugte „Anästhesie" in letzter Linie stets auf dem gleichen physikalisch-chemischen Vorgang beruht.

Zusammenfassung.

Es werden die über die Beziehungen zwischen Narkose und Sauerstoffatmung vorliegenden Beobachtungen zusammengestellt, und die Theorien, die die Narkose auf eine Erstickung zurückzuführen suchen, einer Kritik unterworfen. Es wird gezeigt, daß die Narkose nicht einfach durch Oxydationshemmung erklärt werden kann, da die Narkotisierbarkeit nicht an den Ablauf von Oxydationsprozessen geknüpft ist und vor allem auch dauernd anoxybiotisch lebende Organismen (Spulwürmer) narkotisierbar sind. Die Oxydationshemmung ist daher nur eine Teilerscheinung der Narkose, die den allgemeineren und umfassenderen Vorgang darstellt, dem möglicherweise auch die asphyktischen Erscheinungen anzugliedern wären.

---

[1]) Cl. Bernard, Leçons sur les anesthésiques et sur l'asphyxie. S. 143. Paris 1875.

Zur Wirkung der Lecithine bei Vergiftungen der höheren Tiere.

Von

E. Hanschmidt.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Jurjew.)

(Eingegangen am 26. April 1913.)

In seinen grundlegenden Untersuchungen über Narkose erkannte Overton[1]) zuerst, daß ein Narkoticum (Äther, Chloroform, Alkohol) um so stärker wirkt, je leichter es sich in gewissen fettähnlichen Stoffen löst, die in der Zellmembran enthalten sind. Diese nannte er Lipoide und zählte zu ihnen zunächst das Cholesterin und seine Derivate, dann auch das Lecithin und fette Öle. Nach seinen Untersuchungen wirken die Narkotica in erster Linie in der Weise, daß sie in die lecithin- und cholesterinartigen Bestandteile der Zellen übergehen und hierdurch den physikalischen Zustand dieser „Gehirnlipoide" so verändern, daß sie entweder selbst ihre normalen Funktionen innerhalb der Zelle nicht mehr vollziehen können oder störend auf die Funktionen anderer Zellenbestandteile wirken. H. Meyer[2]) kam unabhängig von Overton zu ähnlichen Resultaten.

Unter den Lipoiden nimmt das Lecithin oder die Gruppe der Lecithine (Monoaminomonophosphatide) eine hervorragende Stellung ein.

Ihre chemischen und biochemischen Eigenschaften sind von verschiedenen Autoren [Bang[3]), Glikin[4])] eingehend studiert worden. Die

---

[1]) Overton, Studien über die Narkose. Jena 1901.

[2]) Meyer, Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 42, 1898.

[3]) I. Bang, Chemie u. Biochemie der Lipoide. Wiesbaden 1911.

[4]) Glikin, Chemie der Fette, Lipoide u. Wachsarten. Berlin 1913.

Lecithine besitzen nicht nur eine eminente biologische Bedeutung, sondern sie sind auch Träger verschiedener interessanter physiko-chemischer, physiologischer und pharmakodynamischer Eigenschaften.

Auch die Wirkung der spezifischen Zellgifte, vor allem der hämolytischen Blutzellengifte, der Toxine, Hämolysine usw. steht in augenscheinlichen Beziehungen zu den Lecithinen. Diese Gifte scheinen geradezu chemisch mit den Lecithinen zu reagieren, letztere scheinen ihnen als Aktivator oder als Komplement zu dienen; auch bei der Wirkung anderer aktiver Stoffe, insbesondere der Fermente, spielen die Lecithine eine wichtige, aber noch nicht genügend geklärte Rolle.

Die pharmakodynamischen Eigenschaften der Lecithine sind bis jetzt wenig untersucht worden, und erst in letzter Zeit hat man ihnen auf diesem Gebiete mehr Aufmerksamkeit gewidmet.

W. J. Danilewsky[1]) hat zuerst darauf hingewiesen, daß die Lecithine in Verdünnungen von 0,01% und weniger einen stimulierenden Einfluß auf das isolierte Kalt- und Warmblüterherz ausüben; er hält die Lecithine für einen wichtigen chemischen Regulator des Herzens, für ein „cardiomusculares" Stimulans.

Die Versuche M. Kaznelsons[2]) an isolierten normalen und vergifteten Herzen warmblütiger Tiere ergaben, daß die Lecithine selbst in Verdünnungen von 1 : 500000 eine günstige Wirkung auf das normale Herz ausüben; bei vergifteten Herzen hatten schon Konzentrationen von 1 : 50 000 eine deutliche belebende Wirkung und verstärkten die Amplitude der Herzcontractionen.

D. Lawrow und W. Woronzow[3]) berichten in einer sehr ausführlichen Arbeit über die Wirkung der Lecithine auf das nicht isolierte Herz bei Vergiftungen warmblütiger Tiere. Zur Vergiftung diente Äthylalkohol, Chloralhydrat, Schwefeläther, Chloroform, ein sehr wirksames Muscarin und verschiedene Kombinationen dieser Stoffe.

Die Autoren stellten fest, daß die Lecithine in Dosen von 0,02 bis 0,05 g pro 1 kg des Tieres bei Vergiftungen mit den erwähnten Substanzen eine deutliche belebende Wirkung auf das Herz ausüben, was sich in der Verstärkung der Herzcontractionen und Hebung des Blutdruckes dokumentierte. Sogar Dosen von 1 bis 1,8 g pro 1 kg wurden vom Herzen gut vertragen.

J. Nerking[4]) hat den Einfluß der Lecithine auf den Verlauf der Narkose, die durch Äther, Chloroform, Morphium, Urethan, Novocain, Stovain und Chloralhydrat hervorgerufen wurde, näher geprüft. Als Versuchstiere dienten Hunde, Kaninchen, Ratten. Die Lecithine wurden

---

[1]) W. Danilewsky, Charkower med. Journ. **1906**, 273.

[2]) M. Kaznelson, Über die Wirkung der Lecithine auf das isolierte Warmblüterherz. Jurjew 1910 (russisch).

[3]) D. Lawrow und W. Woronzow, Über die Wirkung der Lecithine im tierischen Organismus auf das Herz bei Vergiftungen. Jurjew 1912 (russisch).

[4]) J. Nerking, Münch. med. Wochenschr. **1909**, 1475.

in 1 bis 10%iger Kochsalzaufschwemmung teils intravenös, teils subcutan injiziert. Zu seinen Versuchen benutzte Nerking ein Präparat der Firma Poulenc (Paris), das er für sehr rein hält. Die Lecithine hatten einen unverkennbaren Einfluß auf den zeitlichen Verlauf und die Nachwirkungen der Narkose, und zwar im Sinne einer Abkürzung der Narkose, einer früheren Rückkehr der Empfindung und einem Ausbleiben übler Nachwirkungen.

H. de Waele[1]) hat die Lecithinwirkung bei einigen Alkaloid- und Toxinvergiftungen erprobt. Zu seinen Versuchen benutzte er Kaninchen und Meerschweinchen; die Vergiftung wurde durch Coniin, Strychnin, Brucin, Cocain, Diphtherietoxin und Ricin bewirkt. Der Autor hat gefunden, daß geringen Dosen von Lecithinen eine giftverstärkende Fähigkeit zukommt; große Dosen hatten einen hemmenden Einfluß auf die Wirkung der Alkaloide resp. der Toxine.

Versuche von D. M. Lawrow[2]) bei Froschvergiftungen haben ergeben, daß die Lecithine unzweifelhaft einen Einfluß auf die Wirkung der Arzneimittel resp. der Gifte ausüben. Bei Vergiftungen mit Strychnin, Curare, Äthylalkohol, Chloralhydrat, Sublimat und Äther riefen die Lecithine eine verschiedene Wirkung hervor: entweder begünstigten sie die Vergiftungen oder im Gegenteil hemmten sie diese, je nach den Dosen. Bei Vergiftungen mit gelbem Phosphor und Phenol wirkten die Lecithine nur nach einer Richtung, und zwar beeinflußten sie die Wirkung dieser Stoffe nur verstärkend. Die mittleren Lecithindosen von D. Lawrow entsprechen annähernd den therapeutischen von J. Nerking und den großen Dosen von H. de Waele.

Ferner berichtet D. M. Lawrow[3]) über eine Reihe von Lecithinversuchen, die an normalen, nicht vergifteten Kaninchen, Katzen und Hunden ausgeführt wurden. Die Injektion der Lecithine geschah teils intraperitoneal in Dosen bis 6 g pro 1 kg des Tieres, teils intravenös in Dosen von 2,5 g pro 1 kg. In allen Fällen wurde das Präparat gut vertragen, was sich in einer Zunahme des Körpergewichts äußerte. Desgleichen ergaben Versuche am Ludwigschen Kymographion, daß den Lecithinen sogar in Dosen von 2 g pro 1 kg eine schäd-

[1]) H. de Waele, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Ther. 3, 1909.

[2]) D. M. Lawrow, Zur Frage des Einflusses der Lecithine auf die Wirkung der Arzneimittel. Jurjew 1911 (russisch).

[3]) D. M. Lawrow, Charkower med. Journ. 1912.

liche Wirkung auf das Herz und Gefäßsystem nicht zukommt. Weitere Versuche stellte der Autor an, um festzustellen, in welcher Zeit und in welchem Maße die Lecithine bei intraperitonealer Einführung resorbiert werden. Zu dem Zwecke wurden die Tiere nach Ablauf von 8 bis 23 Stunden nach der Injektion der Lecithine entblutet, die Bauchhöhle eröffnet, die Reste der Lecithinemulsion gesammelt, die Peritonealhöhle mit warmem Wasser durchspült und mit hygroskopischer Watte ausgewischt. Die gesammelten Flüssigkeiten wurden wiederholt mit Schwefeläther extrahiert; die ätherischen Auszüge wurden entwässert, eingedickt und im Vakuumexsiccator bei Zimmertemperatur getrocknet. Aus den Versuchen geht hervor, daß die Lecithine aus der Peritonealhöhle verhältnismäßig schnell und gut resorbiert werden; so waren beispielsweise in 20 Stunden ca. 98% der injizierten Lecithinemulsion resorbiert worden; auf das Körpergewicht berechnet, wurden ca 5 g des reinen Präparates pro 1 kg des Tieres in 24 Stunden resorbiert. Das von D. Lawrow angewandte Lecithinpräparat wurde von ihm selbst gewonnen und ist als ein chemisch sehr reines zu bezeichnen.

Meine Lecithinversuche bilden die Fortsetzung der oben erwähnten. Zur Vergiftung benutzte ich Curare, Ricin, Strychninnitrat, Äthylalkohol, Chloralhydrat, Veronalnatrium, Morphin und Phosphor. Als Versuchstiere dienten Kaninchen, Meerschweinchen, Hunde, Mäuse. Es wurden meist relativ große Lecithindosen angewandt, denn es schien mir zunächst wichtig, in den Hauptzügen festzustellen, ob den Lecithinen ein Einfluß auf die Wirkung verschiedener Arzneimittel, resp. Gifte zukommt. Bei den Hypnoticis der Alkoholgruppe und beim Morphin wurden die Lecithine vor der Narkose eingeführt, denn es erschien mir durchaus geboten, während der Narkose an den Tieren keine Manipulationen vorzunehmen. In den anderen Fällen wurden die Lecithine teils vor, teils nach der Einführung des Giftes injiziert. Besonderes Augenmerk habe ich auf die Kontrollversuche gerichtet; da die Injektion der Lecithine mit einer Verdünnung des Blutes verbunden ist, wurde den Kontrolltieren das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung eingespritzt. Zur Kontrolle dienten, wie im weiteren ausgeführt ist, meist dieselben Tiere.

Experimenteller Teil.

Zu den im folgenden beschriebenen Versuchen wurde kein Handelslecithin benutzt, sondern das Präparat wurde aus frischem Eigelb nach folgender Methode selbst hergestellt. Die von Eiweiß getrennten Dotter wurden durch Verreiben mit Natrium sulfuric. siccum entwässert und bei Zimmertemperatur mit Schwefeläther, bis dieser keine deutlich gelbe Farbe mehr annahm, extrahiert. Der Äther wurde abdestilliert, der nachbleibende Lecithinextrakt wurde auf dem Dampfbade eingedickt, in Äther gelöst und so lange mit Aceton versetzt, als noch ein Niederschlag ausfiel. Das Lösen in Äther und Ausfällen mit Aceton wurde 5 mal wiederholt. Das so erhaltene Lecithinpräparat stellte eine wachsartige, knetbare, hellgelbliche Masse dar; in Äther, Alkohol und Chloroform löste es sich, in kaltem Aceton war es unlöslich. Die Hauptmasse des Präparats wurde unter Aceton aufbewahrt. Die Anwendung der Lecithine geschah in Form von 5 bis 10⁰/₀iger Emulsion in 0,9⁰/₀iger Kochsalzlösung. Die Zubereitung erfolgte in der Weise, daß ein bestimmtes Quantum einer 20⁰/₀igen ätherischen Lecithinlösung im Porzellanschälchen verdampft wurde; der Rückstand wurde mit physiologischer Kochsalzlösung im Mörser sorgfältig verrieben und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Die Lecithinemulsionen wurden stets ex tempore bereitet, mehrmals durch hygroskopische Watte filtriert, im Dampfbade bei 100° 15 bis 20 Minuten sterilisiert und vor der Injektion auf 38 bis 40° erwärmt.

Es erschien mir vor allem wichtig festzustellen, ob dem von mir gewonnenen Lecithinpräparat bei der Einführung in den tierischen Organismus eine toxische Wirkung zukommt und ob die unmittelbare Injektion ins Blut oder in die Peritonealhöhle mit Gefahr verbunden ist. Zu diesen Versuchen wurden relativ größere Dosen angewandt, als solche gewöhnlich bei Experimenten mit Lecithin benutzt werden. Um das Präparat auf Toxizität zu prüfen, wurden im ganzen 15 Versuche angestellt, und zwar an Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden und Mäusen. In drei Fällen wurden die Lecithine direkt in die Blutbahn eingespritzt, und zwar in die Vena jugularis, in zehn Fällen wurden sie in die Peritonealhöhle injiziert, in zwei Fällen subcutan. Um festzustellen, ob die Lecithine Anaphylaxie hervor-

rufen können, wurden einigen Tieren wiederholte Einspritzungen gemacht, und zwar in verschiedenen Abständen. Die Tiere wurden nach der Injektion längere Zeit beobachtet, wobei das Hauptaugenmerk auf den Allgemeinzustand, Appetit, Körpergewicht, Darm- und Nierenfunktion gerichtet wurde. Es sei gleich bemerkt, daß das Präparat in allen Fällen gut vertragen wurde. Der Zustand der Versuchstiere war die ganze Zeit hindurch vollständig normal, der Appetit gut; in den Faeces und im Urin konnte nichts Anormales nachgewiesen werden. Desgleichen ist es mir nicht gelungen, anaphylaktische Erscheinungen hervorzurufen. In den ersten Tagen nach der Injektion stellte sich meist eine Abnahme des Körpergewichts ein; ich fasse diese als einen gesteigerten Stoffwechselumsatz auf; im weiteren Verlauf erfolgte meist eine bedeutende Zunahme des Gewichts.

Der Kürze wegen verzichte ich hier auf eine Wiedergabe aller Versuchsprotokolle und führe nur einige Beispiele an. Eine Zusammenstellung dieser Versuche ist aus der Tabelle I zu ersehen.

Versuch 1.

22. IX. 1912. Ein Kaninchen von 2310 g erhielt 46 ccm einer 5%igen Lecithinemulsion intravenös injiziert (1 g pro 1 kg des Tieres). Am 24. IX. war das Gewicht auf 2230 g gefallen, um allmählich wieder in die Höhe zu gehen. Am 30. IX. wog das Tier 2400 g und am 20. X. 2430 g; mithin war in 31 Tagen eine Gewichtszunahme von 120 g erfolgt.

Versuch 4.

24. IX. 1912. Ein Meerschweinchen von 810 g erhielt 40,5 ccm einer 10%igen Lecithinemulsion intraperitoneal injiziert (5 g pro 1 kg des Körpergewichts). Am 26. IX. betrug das Gewicht 780 g, am 29. IX. bereits 850 g, um auf dieser Höhe zu bleiben.

Versuch 5.

24. IX. 1912. Ein Hund von 10 kg erhielt 400 ccm einer 5%igen Emulsion intravenös injiziert (2 g pro 1 kg des Körpergewichts). Am 30. IX. war das Gewicht auf 9,850 kg gefallen. Am 10. X. hatte das Tier das Anfangsgewicht wieder erreicht. Eine weitere Gewichtszunahme erfolgte nicht, vermutlich weil die Gefangenschaft schlecht vertragen wurde.

Versuch 10.

15. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1350 g erhielt 13,5 ccm einer 10%igen Emulsion intraperitoneal injiziert. Das Gewicht des Tieres war am 20. XI auf 1200 g gefallen und betrug am 23. XI. 1250 g. Es

wurden dann wiederholte intraperitoneale Injektionen von 1 bis 2 g Lecithin pro 1 kg des Körpergewichts gemacht, und zwar in einem Zeitraum von 4 Wochen 5 Injektionen. Die Gewichtszunahme betrug bis zum 20. XII. 190 g.

Versuch 12.

15. XI. 1912. Ein Meerschweinchen von 650 g erhielt 6,5 ccm einer 10%igen Lecithinemulsion intraperitoneal eingespritzt (1 g pro 1 kg des Körpergewichts). Am nächsten Tage war das Gewicht des Tieres auf 610 g gefallen, ging dann aber progressiv in die Höhe und betrug am 23. XI. bereits 750 g. Es wurden dann 4 weitere Injektionen von 1 bis 2 g pro 1 kg in Abständen von 5 bis 12 Tagen gemacht. Das Gewicht betrug am 21. XII. 700 g, das Tier war vollständig normal.

Versuch 14 und 15.

23. XI. 1912. 2 Hundeweibchen von 400 g und 350 g Gewicht erhielten wiederholte subcutane Lecithininjektionen von 0,5 bis 2 g pro 1 kg; die eingeführte Emulsion wurde anscheinend schnell resorbiert. Das Wachstum der Tiere erfolgte unbehindert, und der Allgemeinzustand war ein durchaus guter.

Tabelle I.

Prüfung der Lecithine.

Tier	Versuch Nr.	Körpergewicht des Tieres g	Dosis der injizierten Lecithine pro 1 kg des Tieres g	Art der Einführung	Dauer der Beobachtung Tage	Veränderungen des Gewichts g
Kaninchen	1	2310	1	intravenös	31	+ 120
	2	1690	2	"	31	+ 170
	6	1400	5	intraperitoneal	34	+ 220
	7	1430	7	"	31	+ 120
	8	640	10	"	6	+ 30
	10	1350	5 mal 1—2	"	37	+ 190
	11	1330	5 mal 1	"	37	+ 290
Meerschweinchen	3	830	3	"	31	+ 30
	4	810	5	"	31	+ 40
	12	650	5 mal 1—2	"	37	+ 50
	13	540	5 mal 1	"	37	+ 60
Hunde	5	10000	2	intravenös	17	unverändert
	14	400	5 mal 0,5—1	subcutan	49	+ 650
	15	350	5 mal 1—2	"	49	+ 800
Mäuse	9	25	1—5	intraperitoneal	33	—

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Lecithine in Form von Emulsionen mit physiologischer Kochsalzlösung intravenös, intraperitoneal oder subcutan eingeführt werden können. Die direkte Injektion ins Blut sogar größerer Lecithindosen, wie 1 bis 2 g pro 1 kg des Tieres, ist mit keinen Gefahren für

den Organismus verbunden; Embolien oder Störungen des Allgemeinzustandes wurden in keinem Falle beobachtet. Die Lecithine können sogar in großen Dosen wiederholt eingespritzt werden.

Versuche mit Curare.

1 g Curare (Merck) wurde mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben, auf ein Volumen von 100 ccm gebracht, wiederholt geschüttelt und nach 24 Stunden filtriert. Die Toxizität dieser Lösung wurde zuerst an Fröschen von ca. 50 g Gewicht geprüft.

I. 3 Fröschen wurde subcutan zu je 0,1 ccm injiziert = 0,001 g Curare; von diesen Fröschen lag der erste ca. 168 Stunden auf dem Rücken, die beiden anderen gingen ein.

II. 3 Frösche erhielten subcutan zu je 0,05 ccm = 0,0005 g Curare; von diesen ging der erste ein, der zweite lag ca. 120 Stunden auf dem Rücken, der dritte ca. 144 Stunden.

27. X. 1912. Ein Kaninchen von 1720 g erhielt um $3^h 20'$ 1 ccm der $1\,^0/_0$igen Curarelösung (= 0,01 g) subcutan injiziert. Um $3^h 21'$ liegt das Tier auf dem Bauch, es besteht starke Atemnot, um $3^h 30'$ erfolgen nur noch sehr schwache Bewegungen des Brustkorbes. $3^h 35'$ Stillstand der Atmung. Stark ausgeprägte Cyanose. Tod.

Folglich war das benutzte Curarepräparat recht wirksam.

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden an Kaninchen ausgeführt.

Versuchsanordnung.

Das Tier wurde tracheotomiert, die Vena jugularis freigelegt und eine Kanüle eingebunden. Der N. ischiadicus wurde isoliert, auf eine gabelförmige Platinelektrode genommen und die Norm bei Reizung des Nerven mit dem Induktionsstrom bestimmt, d. h. der Stand der sekundären Spule, bei dem sich eine minimale Zuckung der Pfote erzielen ließ; diese erhielt man meist bei 360 bis 370 mm. Als sehr praktisch erwies sich für diese Versuche das Vertikalinduktorium (E. Zimmermann); der Stand der sekundären Rolle ist an einer Millimeterteilung einstellbar und läßt sich an der Skala leicht ablesen. Der Nerv wurde mit einem in $0{,}9\,^0/_0$iger NaCl-Lösung getränkten Wattebausch bedeckt gehalten. Die Curarelösung wurde intravenös injiziert und die Erregbarkeit der motorischen Nervenendigungen durch Reizung des Nerven mit dem Induktionsstrom von Zeit zu Zeit geprüft; doch wurde, um Schädigungen des Nerven zu verhüten, nur bis 50 mm Spulenabstand herabgegangen. Die künstliche Atmung wurde unmittelbar nach

der Curareinjektion eingeleitet und durch einen Respirationsapparat mit Motorbetrieb bewerkstelligt. Das Tier wurde, um es vor Wärmeverlust zu schützen, mit warmen Tüchern bedeckt gehalten.

Versuch 16a.

7. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1610 g erhielt 40 Min. vor der ersten Curareeinführung 32 ccm einer 5%igen Lecithinemulsion intravenös injiziert.

Zeit	Quantum der injizierten 1%igen Curarelösung pro 1 kg ccm	Stand der sekundären Rolle mm	Reizung des Ischiadicus	Bemerkungen
10h45'	—	370	Norm	
11h03'	1,0	—	—	
12'	—	50	keine Reaktion	
33'	—	250	Zuckung der Pfote	
53'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung der Erregbarkeit in 50 Min.
12h00'	0,6	—	—	
55'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung in 55 Min.
1h00'	0,6	—	—	
55'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung in 55 Min.
59'	1,3	—	—	
2h12'	—	50	keine Reaktion	
3h10'	—	60	Zuckung der Pfote	
30'	—	200	do.	
44'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung in 1 Std. 55 Min.
45'	—	—	—	Eigenbewegungen

Versuch 16b (Kontrolle).

13. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1620 g erhielt 40 Min. vor der ersten Curareeinführung 32 ccm einer 0,9%igen NaCl-Lösung intravenös injiziert.

Zeit	Quantum der injizierten 1%igen Curarelösung pro 1 kg ccm	Stand der sekundären Rolle mm	Reizung des Ischiadicus	Bemerkungen
11h00'	—	370	Norm	
30'	1,0	—	—	
35'	—	50	keine Reaktion	
12h27'	—	80	Zuckung der Pfote	
45'	—	260	do.	
58'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung der Erregbarkeit in 1 Std. 28 Min.
1h00'	0,6	—	—	
2h16'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung in 1 Std. 16 Min.
20'	0,6	—	—	
3h35'	—	360	do. Norm	Wiederherstellung in 1 Std. 15 Min.
40'	1,3	—	—	
50'	—	50	keine Reaktion	
5h15'	—	50	" "	Tier tot.

Versuch 17a.

3. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1540 g erhielt 22 Min. nach der ersten Curareeinführung 30 ccm einer 5%igen Lecithinemulsion intravenös injiziert.

Zeit	Quantum der injizierten 1%igen Curarelösung pro 1 kg ccm	Stand der sekundären Rolle mm	Reizung des Ischiadicus	Bemerkungen
10h 20′	—	370	Norm	
50′	1,5	—	—	
11h 12′	—	50	keine Reaktion	Lecithininjektion
35′	—	50	do.	
40′	—	325	Zuckung der Pfote	
44′	—	360	do. Norm	Wiederherstellung der Erregbarkeit in 32 Min.
12h 00′	0,6	—	—	
1h 05′	—	250	Zuckung der Pfote	
10′	0,7	—	—	
20′	—	50	keine Reaktion	
40′	—	120	Zuckung der Pfote	
2h 18′	—	350	do. Norm	Wiederherstellung in 1 Std. 8 Min.

Versuch 17b (Kontrolle).

6. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1540 g erhielt 22 Min. nach der ersten Curareeinführung 30 ccm einer 0,9%igen NaCl-Lösung intravenös injiziert.

Zeit	Quantum der injizierten 1%igen Curarelösung pro 1 kg ccm	Stand der sekundären Rolle mm	Reizung des Ischiadicus	Bemerkungen
10h 20′	—	370	Norm	
38′	1,5	—	—	
58′	—	50	keine Reaktion	
11h 00′	—	50	do.	0,9%ige NaCl-Injektion
13′	—	50	do.	
12h 00′	—	80	Zuckung der Pfote	
40′	—	210	do.	
1h 05′	—	360	do. Norm	Wiederherstellung der Erregbarkeit in 2 Std. 5 Min.
08′	0,6	—	—	
2h 25′	—	250	Zuckung der Pfote	
30′	0,7	—	—	
40′	—	50	keine Reaktion	
3h 50′	—	120	Zuckung der Pfote	
4h 40′	—	350	do. Norm	Wiederherstellung in 2 Std. 10 Min.

Zusammenfassung.

1. Die Lecithine wirken hemmend auf die Curarevergiftung.
2. Die Wiederherstellung der Erregbarkeit der motorischen Nervenendigungen erfolgt bei den Lecithintieren in bedeutend

kürzerer Zeit und ruckweise, besonders wenn die Lecithine nach der Curareeinführung injiziert werden.

3. Die Lecithintiere vertragen eine größere Curaremenge als diejenige, die bei den Kontrolltieren bereits tödlich wirkt.

Versuche mit Ricin.

Zu diesen Versuchen wurde ein ungereinigtes Ricinpräparat benutzt, das im Laboratorium nach folgender Methode selbst hergestellt wurde.

Tabelle II.

Ricin.

Versuch Nr.	Lecithin-Mäuse		Kontroll-Mäuse
	Der Tod erfolgte nach Std.	Dosis der Lecithine pro Kilogramm des Tieres g	Der Tod erfolgte nach Std.
18	20 27 29	4	41 41 41
	41 41 41	2	52 53 53
19	50 54 55	0,4	61 61 61
	55 58 52	0,2	60 62 65
20	50 47 50	0,04	52 53 51

100 g sem. Ricini und 100 g Kochsalz wurden im Mörser verrieben und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1000 ccm gebracht. Der Auszug wurde filtriert und zur Konservierung etwas Chloroform hinzugefügt. Der Eiweißgehalt betrug ca. 3‰ nach Esbach. Diese Versuche wurden an weißen Mäusen ausgeführt. Um die Toxizität des Präparates zu prüfen, wurde Mäusen von gleichem Gewicht 1 ccm des Stammpräparates und verschiedener Verdünnungen von 1:50—100—250—500 subcutan injiziert. Am zweckmäßigsten für die Ricinversuche erwies sich eine Verdünnung von 1:500; 1 ccm derselben tötete eine Maus von 40 g in ca. 42 Stunden. Um die Wirkung der Lecithine auf die Ricinvergiftung festzustellen, wurde Mäusen von annähernd gleichem Gewicht das obige Quantum Ricin und gleichzeitig Lecithine in verschiedenen Dosen von 0,001—0,1 g pro Maus von ca. 40 g injiziert (= 0,04—4 g

Lecithine pro 1 kg Gewicht), den Kontrollmäusen außer Ricin das entsprechende Volumen 0,9%ige NaCl-Lösung. Das Ricin wurde unter die Rückenhaut injiziert, die Lecithine bzw. die physiologische Kochsalzlösung in die Peritonealhöhle. Der Kürze wegen verzichte ich hier auf die Wiedergabe der Versuchs- und Sektions-Protokolle; die Resultate dieser Versuche sind aus der Tabelle II zu ersehen.

Zusammenfassung.

1. Die Lecithine begünstigen die Ricinvergiftung.

2. Große Lecithindosen, 2 bis 4 g pro Kilogramm, beschleunigen den Tod der Mäuse um ca. 20 bis 40%.

3. Kleinere Lecithindosen, 0,04 bis 0,4 g pro Kilogramm, haben ebenso einen deutlichen sensibilisierenden Einfluß auf die Ricinvergiftung.

Versuche mit Strychninnitrat.

Das Strychninnitrat verursacht beim Kaninchen bei subcutaner Einführung schon in Dosen von 0,5 bis 0,8 mg pro Kilogramm Körpergewicht starke klonische Krämpfe oder Tetanus. Es erschien mir nun wichtig festzustellen, ob die vorherige Injektion der Lecithine die Wirkung des Strychninnitrats zu beeinflussen vermag.

Es wurden zu diesen Versuchen Kaninchen von möglichst gleichem Alter und Gewicht genommen. Die Lecithinemulsion wurde ca. 30 bis 40 Minuten vor der Strychnininjektion intravenös eingeführt, die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen physiologischer Kochsalzlösung. Die verschiedenen Grade der Reaktion sind, wie aus der Tabelle ersichtlich, der Intensität und der Zahl der Anfälle entsprechend mit ¹, ² und ³ bezeichnet. Die Versuche 21 bis 24 sind an verschiedenen Tieren gemacht, bei den übrigen Versuchen wurde eine andere Anordnung gewählt, und zwar diente dasselbe Tier zum Lecithinversuch und nach Ablauf von 8 bis 10 Tagen als Kontrolle, oder umgekehrt. In den Versuchen 25 bis 26 wurden die Tiere zuerst zur Kontrolle benutzt und dann zum Lecithinversuch. Beim Versuch 27 diente das Tier zuerst zum Lecithinversuch und dann als Kontrolle. Bemerkenswert ist, daß die Kontrolltiere sämtlich mit heftigem Tetanus reagierten, bei den Lecithintieren fehlte die Reaktion oder sie war bedeutend schwächer — leichte, kurzandauernde klonische Krämpfe —, und nur bei einem Tier stellte sich ein schwacher Tetanus ein. Die Versuche 25 bis 27, die an denselben Tieren ausgeführt sind, veranschaulichen mit großer Deutlichkeit die Wirkung der Lecithine auf die Strychninvergiftung: der Ausbruch des Tetanus wurde vollständig coupiert.

Tabelle III.
Strychninum nitricum.

Versuch Nr.	Dosis des Strychninum nitricum pro 1 kg des Tieres g	Resultat des Versuchs		Dosis der Lecithine pro 1 kg des Tieres g
		Kontrolltiere	Lecithintiere	
21	0,0005	Tetanus [2—3]	klon. Krämpfe [1]	1
22	0,0008	„ [2—3]	„ „ [1]	1
23	0,0008	„ [2—3]	Tetanus [1]	1
24	0,0008	„ [2—3]	Reaktion fehlt	2
25	0,0006	„ [2—3]	„ „	2
26	0,0006	„ [3]	leichte Zuckungen	1
27	0,0006	„ [2—3]	Reaktion fehlt	2

Versuche mit Äthylalkohol.

Als Versuchsobjekte dienten Kaninchen; dieselben Tiere wurden zum Lecithinversuch und als Kontrolle benutzt. Bei den Versuchen 28 bis 30 dienten die Tiere zuerst zum Lecithinversuch und nach Ablauf von 10 bis 14 Tagen als Kontrolle, bei den übrigen Versuchen in umgekehrter Anordnung. Der Alkohol wurde in 40 $^0/_0$ iger Lösung mit der Schlundsonde eingeführt. Die Dosis betrug 5 ccm Alkohol abs. pro 1 kg des Tieres. Die Dauer der Alkoholvergiftung entsprach dem Zeitraum, als das Tier zu taumeln anfing, sich auf die Seite legen ließ und sich wieder frei bewegen konnte. Als Beispiel führe ich einen Versuch nebst Kontrolle an und verweise im übrigen auf die Tabelle IV.

Versuch 28a.

10. X. 1912. Ein Kaninchen von 1700 g erhielt um

2^h 10′ 68 ccm einer 5 $^0/_0$ igen Lecithinemulsion intravenös injiziert.

3^h 10′ Alkoholeinführung.

3^h 35′ sitzt wie normal, läßt sich nicht auf die Seite legen.

3^h 50′ bewegt sich träge, Gang etwas unsicher.

4^h 00′ liegt auf dem Bauch, wird auf die Seite gelegt, kehrt sich wieder auf den Bauch.

4^h 30′ läßt sich auf die Seite legen, Reflexe etwas herabgesetzt (Nadelstiche, Kneifen des Schwanzes), Muskeltonus kaum verändert, Ohren warm, keine Cyanose.

5^h 00′ Tier in halbliegender Stellung, Reflexe deutlich.

5^h 35′ sitzt, hält den Kopf gerade, läßt sich nicht auf die Seite legen.

6^h 00′ bewegt sich frei, Muskeltonus und Reflexe normal.

Dauer der Alkoholwirkung 1 Std. 35 Min.

Versuch 28b. (Kontrolle.)

25. X. 1912. Dasselbe Kaninchen (Gewicht 1720 g) erhielt um 12h 20′ 68 ccm einer 0,9%igen NaCl-Lösung intravenös injiziert.

1h 20′ Alkoholeinführung.

1h 25′ bewegt sich träge, taumelt.

1h 30′ liegt auf dem Bauch, läßt sich auf die Seite legen.

2h 00′ liegt auf der Seite, Reflexe stark herabgesetzt (Nadelstiche, Kneifen des Schwanzes). Muskulatur vollständig schlaff.

3h 00′ idem. Starker Tremor der Extremitäten. Ohren kalt und cyanotisch.

4h 00′ liegt auf dem Bauch, hebt ab und zu den Kopf.

5h 00′ versucht sich aufzurichten, fällt auf die Seite. Reflexe stark herabgesetzt.

6h 00′ erhebt sich schwerfällig, geht unsicher und taumelt; läßt sich auf die Seite legen, kehrt sich träge auf den Bauch.

7h 00′ Muskeltonus gering, Reflexe noch deutlich herabgesetzt, Gang träge und unsicher.

Dauer der Alkoholwirkung mindestens 4 Std. 30 Min.

Tabelle IV.
Äthylalkohol.

Versuch Nr.	Dosis des Alkohols pro 1 kg des Tieres ccm	Dauer der Alkoholwirkung		Dosis der Lecithine pro 1 kg des Tieres g
		Kontrolltiere	Lecithintiere	
28	5	4 Std. 30 Min.	1 Std. 35 Min.	2,0
29	5	5 „ 15 „	keine Reaktion	2,0
30	5	5 „ 40 „	2 Std. 15 Min.	1,0
31	5	4 „ 35 „	2 „ 15 „	2,0
32	5	4 „ 15 „	1 „ 50 „	1,0
33	5	3 „ 48 „	2 „ 10 „	0,5

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß die Lecithine einen hemmenden Einfluß auf die Alkoholvergiftung ausüben. Bei den Kontrolltieren hielt die Alkoholwirkung im Durchschnitt 4 Std. 40 Min. an, bei den Lecithintieren nur 1 Std. 40 Min. Außerdem ist bemerkenswert, daß bei den Lecithintieren die ersten Symptome der Alkoholwirkung verzögerter auftraten, als bei den Kontrolltieren.

Versuche mit Chloralhydrat.

Durch Vorversuche wurde festgestellt, daß das Chloralhydrat bei subcutaner Einführung von 0,7 g pro 1 kg in 10%iger wässeriger Lösung beim erwachsenen Kaninchen einen mehr

stündigen festen Schlaf hervorruft. Weitere Versuche sollten nun ergeben, ob den Lecithinen bei vorheriger Einführung ins Blut ein Einfluß auf die hypnotische Wirkung des Chloralhydrats zukommt. Zum Lecithinversuch und zur Kontrolle wurden dieselben Tiere benutzt; zwischen beiden Versuchen lag ein Zeitraum von 6 bis 10 Tagen. Bei den Versuchen 34 bis 38 wurden die Tiere zuerst als Kontrolle benutzt und später zum Lecithinversuch, bei den übrigen Versuchen war die Anordnung eine umgekehrte. Die Tiere befanden sich während des Versuchs in einem geräuschfreien Raum und wurden ununterbrochen beobachtet. Der Kürze wegen gebe ich nur ein Versuchsprotokoll nebst Kontrolle wieder. Die Resultate der Versuche sind aus der Tabelle V zu ersehen.

Versuch 34b. (Kontrolle.)

4. X. 1912. Ein Kaninchen von 2100 g erhielt um
11h 00′ 42 ccm einer 0,9 %igen NaCl-Lösung intravenös injiziert.
11h 30′ Chloralhydrateinspritzung.
11h 37′ Tier müde, in halbliegender Stellung, Kopf herabhängend.
11h 40′ fällt auf die Seite, schläft sofort ein.
11h 50′ Atmung verlangsamt und schnarchend.
12h 00′ Reflexe stark herabgesetzt (Kneifen des Schwanzes).
12h 30′ Schlaf sehr fest, Corneal- und Hautreflexe erloschen.
2h 00′ idem.
3h 10′ hebt den Kopf, kehrt sich auf den Bauch.
3h 20′ versucht sich aufzurichten, fällt schlapp um.
3h 40′ liegt auf dem Bauch, läßt sich auf die Seite legen.
4h 00′ bewegt sich träge, taumelt, fällt auf die Seite.
5h 00′ Zustand ziemlich normal.
Dauer des Schlafes 3 Std. 30 Min.

Versuch 34a.

10. X. 1912. Dasselbe Kaninchen (Gewicht 2100 g) erhielt um
12h 50′ 42 ccm einer 5 %igen Lecithinemulsion intravenös injiziert.
1h 20′ Chloralhydrateinspritzung.
1h 30′ sitzt wie normal, läßt sich nicht auf die Seite legen.
1h 40′ liegt auf dem Bauch, hält den Kopf gerade.
1h 50′ wird auf die Seite gelegt, kehrt sich auf den Bauch.
2h 00′ liegt auf dem Bauch, ist müde, hebt ab und zu den Kopf.
2h 30′ idem, Reflexe etwas herabgesetzt, schläft nicht.
3h 00′ liegt auf dem Bauch, Reflexe deutlich, schläft nicht.
4h 00′ erhebt sich, Gang unsicher, die hinteren Extremitäten werden nachgeschleppt.
5h 00′ Tier munter, bewegt sich frei.
Schlaf war nicht eingetreten, es bestand nur zeitweilig Müdigkeit.

Tabelle V.
Chloralum hydratum.

Versuch Nr.	Dosis des Chloralum hydr. pro 1 kg des Tieres g	Dauer des Schlafes		Dosis der Lecithine pro 1 kg des Tieres g
		Kontrolltiere	Lecithintiere	
34	0,7	3 Std. 30 Min.	schlief nicht	1,0
35	0,7	2 „ 55 „	„ „	2,0
36	0,7	2 „ 06 „	2 Std. 01 Min.	2,0
37	0,7	4 „ 31 „	3 „ 00 „	1,5
38	0,7	4 „ 31 „	3 „ 20 „	1,0
39	0,7	3 „ 18 „	2 „ 54 „	0,5
40	0,7	4 „ 45 „	2 „ 50 „	1,0
41	0,7	4 „ 59 „	schlief nicht	2,0
42	0,7	4 „ 58 „	2 Std. 05 Min.	1,0

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Lecithine hemmend auf die schlaferregende Wirkung des Chloralhydrats einwirken oder sie völlig aufheben. Die Dauer des Schlafes betrug bei den Kontrolltieren im Durchschnitt 3 Std. 54 Min., bei den Lecithintieren 1 Std. 47 Min.

Versuche mit Veronalnatrium.

Die hypnotische Dosis des Veronalnatriums beträgt beim erwachsenen Kaninchen, wie Vorversuche ergaben, 0,15 g pro 1 kg bei subcutaner Einführung. Die Lecithine wurden ca. 30 bis 40 Min. vor der Einspritzung des Veronalnatriums injiziert. Die Einführung dieses Hypnoticums erfolgte in 10% iger wässeriger Lösung. Zum Lecithinversuch und als Kontrolle wurden dieselben Tiere benutzt. Die Versuche 43 bis 46 wurden zuerst mit Lecithinen gemacht, bei den übrigen Versuchen dienten die Tiere erst als Kontrolle. Als Beispiel führe ich einen Versuch nebst Kontrolle an. Die Resultate der Versuche sind in der Tabelle VI zusammengestellt.

Versuch 43a.

27. XI. 1912. Ein Kaninchen von 1610 g erhielt um
12h 15′ 16 ccm einer 10%igen Lecithinemulsion intravenös injiziert.
12h 45′ Veronalnatrium-Einspritzung.
1h 30′ sitzt wie normal, läßt sich nicht auf die Seite legen.
2h 00′ Tier in halbliegender Stellung, läßt sich auf die Seite legen.
2h 10′ schläft, liegt auf der Seite.
2h 30′ Hautreflexe etwas herabgesetzt, Cornealreflex deutlich.

3^h 00′ schläft fest, Reflexe stark herabgesetzt.
3^h 55′ erwacht, hebt den Kopf.
4^h 00′ sitzt, läßt sich auf die Seite legen, richtet sich langsam auf.
4^h 30′ sitzt, bewegt sich ab und zu, Gang etwas unsicher.
5^h 00′ Tier munter, bewegt sich frei.
Dauer des Schlafes 1 Std. 45 Min.

Versuch 43b (Kontrolle).

4. XII. 1912. Dasselbe Kaninchen (Gewicht 1610 g) erhielt um
10^h 00′ 16 ccm einer 0,9 %igen NaCl-Lösung intravenös injiziert.
10^h 30′ Veronalnatrium-Einspritzung.
11^h 00′ sitzt wie normal, läßt sich nicht auf die Seite legen.
10^h 30′ läßt sich auf die Seite legen, Müdigkeit bemerkbar.
11^h 50′ liegt auf der Seite, schläft.
12^h 00′ Hautreflexe herabgesetzt, Cornealreflex kaum nachzuweisen.
12^h 30′ Reflexe erloschen, schläft sehr fest.
2^h 00′ idem.
3^h 00′ starker Tremor der Extremitäten.
3^h 40′ erwacht, hebt den Kopf.
4^h 00′ liegt auf dem Bauch mit gespreizten Pfoten, kann sich nicht erheben.
4^h 45′ versucht sich aufzurichten, fällt auf die Seite.
5^h 00′ liegt auf dem Bauch, macht keine Gehversuche.
Dauer des Schlafes 3 Std. 50 Min.

Tabelle VI.

Veronalnatrium.

Versuch Nr.	Dosis des Veronalnatr. pro 1 kg des Tieres g	Dauer des Schlafes		Dosis der Lecithine pro 1 kg des Tieres g
		Kontrolltiere	Lecithintiere	
43	0,15	3 Std. 50 Min.	1 Std. 45 Min.	1,0
44	0,15	3 „ 34 „	2 „ 55 „	2,0
45	0,15	3 „ 55 „	3 „ 5 „	0,5
46	0,15	3 „ 20 „	2 „ 5 „	2,0
47	0,15	2 „ 40 „	1 „ 20 „	1,0
48	0,15	3 „ 30 „	1 „ 25 „	0,5
49	0,15	3 „ 20 „	2 „ 5 „	2,0
50	0,15	3 „ 00 „	schlief nicht	2,0

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Lecithine unzweifelhaft einen Einfluß auf die hypnotische Wirkung des Veronalnatriums ausüben, und zwar wurde dessen schlaferregende Wirkung bedeutend abgeschwächt, resp. aufgehoben. Im Durchschnitt schliefen die Kontrolltiere 3 Std. 43 Min., die Lecithintiere nur 1 Std. 50 Min.

Versuche mit Morphium muriaticum.

Die Versuche mit Morphium wurden an 2 erwachsenen Hunden ausgeführt, und zwar diente jeder Hund zu 2 Lecithin- und zu 2 Kontrollversuchen. Das Morphium wurde subcutan injiziert, die Lecithine, bzw. die physiologische NaCl-Lösung intravenös, und zwar ca. 30 bis 60 Min. vor der Morphiumeinspritzung.

Versuch 51a.

17. I. 1913. Ein Hund von 5 kg 600 g erhielt ca. 1 Stunde vor der Morphiumeinspritzung 112 ccm einer $5^0/_0$igen Lecithinemulsion intravenös injiziert (1 g Lecithin pro 1 kg). Dosis des Morphiums 0,009 g pro 1 kg.

Protokollauszug: Nach 35 Min. lag das Tier auf dem Bauch, nach 40 Min. ließ es sich auf die Seite legen. Schlaf trat nicht ein. Das Tier lag auf der Seite ca. 2 Std. Exzitation war nicht wahrzunehmen.

Versuch 51b (Kontrolle).

21. I. 1913. Derselbe Hund (5 kg 600 g) erhielt ca. 1 Std. vor der Morphiumeinspritzung 112 ccm einer $0{,}9^0/_0$igen NaCl-Lösung intravenös injiziert. Dosis des Morphiums 0,009 g pro 1 kg.

Protokollauszug: Nach 7 Min. lag das Tier auf dem Bauch, nach 12 Min. ließ es sich auf die Seite legen. Starkes Exzitationsstadium. Schlaf ca. 1 Std. Nach dem Erwachen lag das Tier ca. 4 Std. auf der Seite.

Ein weiterer Versuch mit demselben Tier ergab ähnliche Resultate.

Versuch 53b (Kontrolle).

18. I. 1913. Hund von 10 kg 500 g erhielt ca. 30 Min. vor der Morphiuminjektion 210 ccm einer $0{,}9^0/_0$igen NaCl-Lösung. Dosis des Morphiums 0,01 g pro 1 kg.

Protokollauszug: Nach 15 Min. lag der Hund auf dem Bauch, nach 1 Std. ließ er sich auf die Seite legen. Starkes Erregungsstadium, reichlicher Speichelfluß. Fester Schlaf ca. 1 Std. 15 Min.

Versuch 53a.

23. I. 1913. Derselbe Hund (10 kg 500 g) erhielt ca. 30 Min. vor der Morphiuminjektion 210 ccm einer $5^0/_0$igen Lecithinemulsion intravenös (1 g Lecithin pro 1 kg). Dosis des Morphiums 0,02 g pro 1 kg, also doppelt so groß wie beim Versuch 53b.

Protokollauszug: Nach 25 Min. lag der Hund auf dem Bauch, auf die Seite ließ er sich nicht legen. Schlaf trat nicht ein. Erregungsstadium relativ gering.

Ein zweiter Versuch mit demselben Hunde stimmte mit obigem in den Hauptzügen überein.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Lecithine unzweifelhaft einen hemmenden Einfluß auf die Morphinvergiftung ausüben.

Versuche mit Phosphor.

Diese Versuche wurden mit gelbem Phosphor an 15 Kaninchen in 3 Versuchsreihen zu je 5 Kaninchen ausgeführt. Die Tiere wurden 2 Monate hindurch mit Phosphor chronisch vergiftet, und zwar wurde der Phosphor, in Öl gelöst, sämtlichen Tieren gleichmäßig in steigenden Dosen von 0,033 bis 0,4 mg pro 1 kg Körpergewicht 2 mal wöchentlich subcutan eingeführt. Die Tiere der 1. Versuchsreihe erhielten nur Phosphor, die der 2. Versuchsreihe außer Phosphor eine relativ kleinere Lecithindosis von 0,2 g pro 1 kg, die der 3. Versuchsreihe Phosphor und eine relativ größere Lecithindosis von 1 g pro 1 kg Gewicht. Die Lecithine wurden unmittelbar nach der Phosphoreinführung injiziert, und zwar in die Peritonealhöhle. Die Tiere wurden durch Abzeichen kenntlich gemacht und in einem größeren Raum gemeinsam gehalten; als Futter erhielten sie Hafer und Klee in genügender Menge.

Vor jeder Phosphoreinführung wurde das Gewicht bestimmt. Die Veränderungen des Gewichts, die den einzelnen Versuchstagen entsprechen, sind für jedes Tier und im Durchschnitt in Prozenten berechnet in den Tabellen wiedergegeben. Da demnächst eine mikroskopische Untersuchung der Organe vorgenommen werden soll, so lassen sich gegenwärtig vergleichende Schlüsse nur aus den Veränderungen des Gewichts und aus dem Allgemeinzustande der Versuchstiere ziehen.

Vergleichen wir die einzelnen Tabellen, so kann man sagen, daß die Tiere der 2. Versuchsreihe, die Phosphor und 0,2 g Lecithin pro 1 kg erhielten, den Phosphor anscheinend besser vertrugen als die Tiere der 1. Versuchsreihe, denen nur Phosphor eingeführt wurde. Dagegen vertrugen die Tiere der 3. Versuchsreihe, die Phosphor und 1 g Lecithin pro 1 kg erhielten, den Phosphor anscheinend schlechter als die Tiere der 1. Versuchsreihe. Dasselbe ist von dem Allgemeinzustand zu sagen. Die Tiere der 2. Versuchsreihe waren die ganze Zeit hindurch munter, die Tiere der 1. Versuchsreihe machten zeitweilig, und die der 3. Versuchsreihe fortdauernd einen schlafferen Eindruck.

Tabelle VII.

Phosphor. Versuchsreihe 1. Kontrolltiere.

Datum 1913	Dosis des Phosphors pro 1 kg des Tieres mg	Kaninchen 1 bis 5 Veränderungen des Gewichts in %					
		1	2	3	4	5	Im Mittel
1. II.	0,033						
5. II.	0,066	+ 3,0	± 0,0	+ 6,0	± 0,0	+ 5,6	+ 2,9
8. II.	0,066	+ 5,6	+ 2,0	+ 3,0	± 0,0	+ 8,0	+ 3,7
11. II.	0,100	+ 8,0	+ 4,0	± 0,0	+ 2,7	+ 8,7	+ 4,7
15. II.	0,100	+ 8,0	+ 6,4	− 5,0	± 0,0	+ 6,0	+ 3,1
20. II.	0,100	− 3,6	+ 0,5	− 13,0	− 8,8	− 6,7	− 6,3
26. II.	0,100	− 0,3	+ 5,0	− 10,3	− 6,0	− 6,0	− 3,5
2. III.	0,100	+ 2,3	+ 4,0	− 7,6	− 5,5	− 5,6	− 2,5
7. III.	0,200	+ 5,0	+ 4,0	− 2,0	− 2,8	+ 1,8	+ 1,2
11. III.	0,200	+ 8,0	+ 4,0	+ 6,0	+ 2,0	+ 8,0	+ 5,6
15. III.	0,200	+ 9,6	+ 6,0	+ 10,0	+ 2,0	+ 8,0	+ 7,1
18. III.	0,400	+ 11,2	+ 4,0	+ 10,8	± 0,0	+ 8,0	+ 6,8
22. III.	0,400	+ 13,2	+ 6,0	+ 8,1	+ 5,5	+ 4,0	+ 7,3
26. III.	0,400	+ 12,6	+ 7,0	+ 3,0	+ 6,0	+ 0,6	+ 5,8
30. III.	0,400	+ 12,6	+ 10,0	+ 6,0	− 4,0	+ 6,0	+ 6,1

Tabelle VIII.

Phosphor. Versuchsreihe 2.
Dosis der Lecithine: 0,2 g pro 1 kg des Tieres.

Datum 1913	Dosis des Phosphors pro 1 kg des Tieres mg	Kaninchen 6 bis 10 Veränderungen des Gewichts in %					
		6	7	8	9	10	Im Mittel
1. II.	0,033						
5. II.	0,066	+ 3,0	+ 6,3	+ 6,8	+ 4,0	+ 1,0	+ 4,2
8. II.	0,066	+ 3,0	+ 7,0	+ 6,8	+ 4,5	+ 1,0	+ 4,4
11. II.	0,100	+ 3,0	+ 8,0	+ 8,0	+ 6,0	+ 2,5	+ 5,5
15. II.	0,100	+ 3,0	+ 12,0	+ 10,8	+ 8,1	+ 2,5	+ 7,3
20. II.	0,100	+ 3,0	+ 13,0	+ 14,0	+ 2,0	− 11,0	+ 4,2
26. II.	0,100	+ 3,0	+ 21,0	+ 10,5	+ 5,0	− 7,0	+ 6,5
2. III.	0,100	+ 3,0	+ 21,0	+ 10,5	+ 5,0	− 3,0	+ 7,3
7. III.	0,200	+ 5,0	+ 5,0	+ 22,0	+ 8,0	+ 3,6	+ 8,7
11. III.	0,200	+ 5,0	+ 12,0	+ 22,0	+ 8,0	+ 9,0	+ 11,2
15. III.	0,200	+ 10,3	+ 15,0	+ 22,0	+ 8,0	+ 9,0	+ 12,8
18. III.	0,400	+ 8,0	+ 15,0	+ 26,0	+ 1,3	+ 9,0	+ 11,9
22. III.	0,400	+ 10,3	+ 19,4	+ 26,0	± 0,0	+ 7,0	+ 12,5
26. III.	0,400	+ 8,0	+ 22,0	+ 22,0	+ 1,0	+ 9,0	+ 12,4
30. III.	0,400	+ 8,0	+ 25,0	+ 22,0	+ 3,6	+ 9,0	+ 13,5

Tabelle IX.

Phosphor. Versuchsreihe 3.

Dosis der Lecithine: 1 g pro 1 kg des Tieres.

Datum 1913	Dosis des Phosphors pro 1 kg des Tieres mg	Kaninchen 11 bis 15 Veränderungen des Gewichts in %					
		11	12	13	14	15	Im Mittel
1. II.	0,033						
5. II.	0,066	− 5,0	± 0,0	± 0,0	+ 2,0	− 2,0	− 1,0
8. II.	0,066	− 9,5	− 2,0	± 0,0	+ 1,0	− 1,0	− 2,3
11. II.	0,100	− 14,0	− 3,0	± 0,0	± 0,0	± 0,0	− 3,4
15. II.	0,100	− 14,0	− 6,3	± 0,0	− 1,0	− 4,0	− 5,0
20. II.	0,100	− 14,0	− 9,7	− 15,0	− 16,0	− 14,0	− 13,7
26. II.	0,100	− 13,0	− 27,0	− 14,0	− 7,4	− 16,0	− 15,4
2. III.	0,100	− 13,0	†	− 14,0	− 7,4	− 14,0	− 12,1
7. III.	0,200	− 14,0		− 10,5	− 6,0	− 9,0	− 9,9
11. III.	0,200	− 14,0		− 7,4	− 3,5	− 9,0	− 8,5
15. III.	0,200	− 12,0		− 5,5	− 1,0	− 4,0	− 5,5
18. III.	0,400	− 10,4		− 7,8	± 0,0	− 2,0	− 5,0
22. III.	0,400	− 10,4		− 2,6	− 1,3	− 3,3	− 4,4
26. III.	0,400	− 9,5		− 4,2	− 1,3	− 3,0	− 4,5
30. III.	0,400	− 5,0		− 5,0	− 1,3	− 3,0	− 3,6

Zusammenfassung.

Aus obigen Versuchen geht hervor, daß den Lecithinen bei der Einführung in den normalen tierischen Organismus eine toxische Wirkung nicht zukommt, und daß selbst sehr große Lecithindosen ohne Gefahr angewandt werden können. Die Injektion der Lecithine kann auf intravenösem, intraperitonealem und subcutanem Wege erfolgen. Unverkennbar ist der Einfluß der Lecithine auf die Wirkung verschiedener Arzneimittel resp. Gifte. Dieser Einfluß ist verschieden, und zwar ist er abhängig erstens von der pharmakodynamischen Natur des angewandtes Giftes. Bei Vergiftung mit Curare, Strychninnitrat, Äthylalkohol, Chloralhydrat, Veronalnatrium und Morphin hatten die Lecithine nur einen Erfolg: sie hemmten die Wirkung der genannten Gifte. Augenscheinlich gibt es aber Gifte, auf deren Wirkung die Lecithine nur einen verstärkenden Einfluß ausüben (Ricin). Zweitens ist der Einfluß der Lecithine abhängig von der angewandten Dosis, wenigstens bei einzelnen Vergiftungen (vgl. Versuche mit Phosphor), und drittens vom Zustande des Organismus resp. vom Gehalt desselben an Lipoiden.

Weitere Versuche sollen zeigen, wie es sich mit den Toxinen verhält.

In den beschriebenen Versuchen waren absichtlich große Lecithindosen (0,5 bis 2 g pro 1 kg) gewählt, um den Einfluß letzterer auf bestimmte Vergiftungen nachzuweisen. Ich bin weit entfernt, die Anwendung solcher großen Lecithindosen auf den Menschen zu übertragen, und ich glaube, daß man mit viel geringeren Dosen auskommen kann. Die ausgeführten Versuche zeigen jedenfalls, daß die pharmakodynamischen und pharmakotherapeutischen Eigenschaften der Lecithine volle Beachtung verdienen.

Über die Mikrobestimmung einiger Blutbestandteile.

Von

Ivar Bang und K. O. Larsson.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Lund.)

(Eingegangen am 26. April 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

In einer vorhergehenden Abhandlung hat der eine von uns[1]) ein Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen beschrieben. Es wurden detaillierte Angaben über die Bestimmung des Blutzuckers und der Chloride gemacht und zugleich das Verfahren zur Mikrobestimmung des Gesamtstickstoffes und des Extraktivstickstoffes, sowie des Hämoglobins und der festen Bestandteile im Prinzip mitgeteilt. Es wurde weiter eine eingehendere Beschreibung dieser Methoden in Aussicht gestellt.

Wir beabsichtigen, in dieser Abhandlung die Mikrobestimmung des Gesamt-N und des Extraktiv-N zu besprechen.

Das Blut wird wie gewöhnlich aus der Randvene des Kaninchenohres oder beim Menschen aus der Fingerkuppe in ein Papierstückchen aufgesaugt. Das Papier wird vor und nach dem Einsaugen des Blutes gewogen, wobei die Torsionswage von Hartmann und Braun verwendet wird. Das Gewicht muß auf $^1/_2$ mg genau sein, was mit der Wage à 500 mg keine Schwierigkeit verursacht (man kann sogar recht genau auf $^1/_8$ mg schätzen).

Für die Bestimmung des Gesamtstickstoffes wird das Papierchen mit mindestens 100 mg Blut (gewöhnlich wurden 130 bis 150 mg aufgesaugt) in einen Kjeldahlkolben aus Jenaglas mit langem Hals und 50 ccm Inhalt (Stehkolben) übergeführt. Man setzt ca. 1,5 ccm konzentrierte Schwefelsäure, 3 bis 4 Tropfen $10^0/_0$ige Kupfersulfatlösung, zwei hirsekorn-

[1]) Bang, diese Zeitschr. **49**, 19, 1913.

große Krystalle von Kaliumsulfat hinzu und erhitzt wie gewöhnlich 3 Stunden auf dem Drahtnetze. Mit Vorteil kann man einen Glasverschluß mit Stiel (z. B. Nr. 1321 des Kataloges der Verein. Fabr. f. Laboratoriumsbed.) einsetzen.

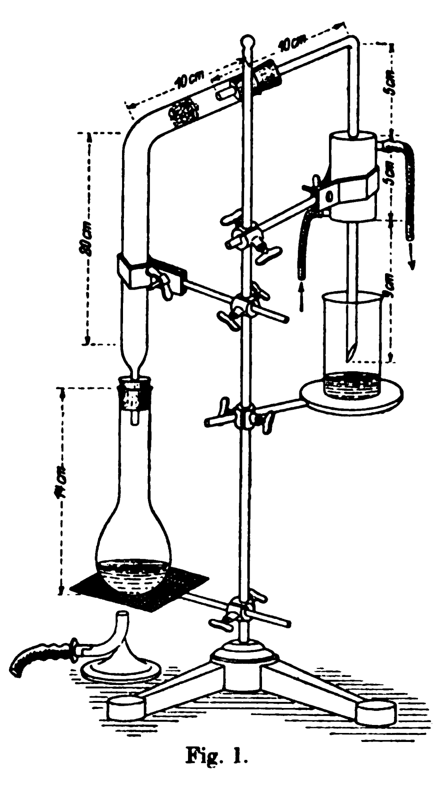


Fig. 1.

Nach beendigtem Kochen kühlt man ab und setzt erstens ca. 10 ccm Wasser hinzu. Man kühlt wieder ab und fügt weiter ca. 10 ccm einer etwa $20^0/_0$igen Kalilauge (nicht Natronlauge) hinzu. Die noch saure Lösung wird wieder abgekühlt und schließlich mit weiteren 10 ccm Kalilauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Die Flüssigkeit wird dadurch nur wenig erwärmt. Man verbindet nun den Kolben mit dem Destillationsapparate und destilliert das Ammoniak in die Titriersäure über. Die Destillation ist in etwa 10 Minuten beendet. Der Destillationsapparat besteht aus einem unten verjüngten Glasrohre mit Stopfen. Das Glasrohr ist oben mit einem Platinröhrchen verbunden, das einen kupfernen Kühler trägt (man kann auch ein platiniertes Silberröhrchen oder ein Röhrchen von Quarz benutzen). Das Destillat wird hierdurch vollständig abgekühlt. Infolgedessen braucht man das Röhrchen nicht in die Titriersäure einzusetzen. Um Spritzen zu verhindern, ist ein Glaswollebausch in das Glasrohr eingesetzt. Die Vorlage besteht aus einem kleinen Becherglase mit 2 bis 3 ccm $^n/_{10}$-HCl und 20 bis 30 ccm Wasser (vgl. die Figur). Es wird auffallen, daß keine Vorrichtung für das Stoßen vorgesehen ist. Bei Verwendung von Kalilauge tritt aber kein Stoßen ein, was bekanntlich bei Verwendung von Natronlauge der Fall ist. Erst dann, wenn alles Ammoniak und das meiste Wasser übergegangen ist, fängt die

Flüssigkeit durch Auskrystallisieren von Kaliumsulfat an zu stoßen. Jetzt wird die Destillation als beendet abgebrochen.

Die Vorteile dieser Anordnung sind einleuchtend: Die Fehlerquellen sind auf ein Minimum reduziert. (Dieselbe Anordnung wird im hiesigen Institut seit Jahren auch bei Makro-Kjeldahl verwendet und hat sich bestens bewährt.) Schließlich hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei dem Mikro-Kjeldahl das Ammoniak jodometrisch nach Kjeldahls Vorschlag zu bestimmen. Zu dem Zwecke setzt man einige Tropfen einer $2\,^0/_0$igen Kaliumjodatlösung und 2 bis 3 Krystalle Jodkalium zu dem Destillat und bestimmt das Jod durch $^n/_{100}$-Thiosulfatlösung (die jeden Tag frisch aus einer $^n/_{10}$-Thiosulfatlösung bereitet wird). Eine 10-ccm-Bürette, in 0,05 ccm eingeteilt, genügt hierzu.

Zur Bestimmung des Extraktivstickstoffes wird das mit Blut beschickte Papierstückchen nach der Wägung in ein Reagensgläschen übergeführt und hier wie bei der Mikrobestimmung des Blutzuckers mit 7 bis 10 ccm kochender, essigsaurer Kaliumchloridlösung extrahiert (150 ccm gesättigte KCl-Lösung mit 70 ccm H_2O verdünnt). Nach mindestens 1 Stunde wird die Salzlösung abgegossen, das Papier in das Kölbchen übergeführt und wie oben verbrannt usw.

Als Belege für die Leistungsfähigkeit der Mikromethode möchten wir folgende Versuche anführen:

Tabelle I.

A. Bestimmungen an Harnstofflösungen.

Makro-Kjeldahl	Mikro-Kjeldahl	Berechnet aus Makro-Kjeldahl
50 ccm = 46,62 mg N	1 ccm = 0,97 mg N	0,93 mg N
	1 „ = 0,96 „	
	1 „ = 0,93 „	
	1 „ = 0,94 „	
	1 „ = 0,93 „	
50 ccm = 32,13 mg N	1 ccm = 0,63 mg N	0,64 mg N
50 „ = 32,17 „ „	1 „ = 0,64 „	
	1 „ = 0,64 „	
	1 ccm = 0,49 mg N	0,47 mg N
	1 „ = 0,50 „	
	1 „ = 0,47 „	
	1 ccm = 0,47 mg N	0,47 mg N
	1 „ = 0,46 „	
	1 „ = 0,47 „	
	1 „ = 0,47 „	

Tabelle II.

B. Bestimmungen an Blut (Mikro-Kjeldahl).

Vers.-Nr.	Blut von	a) Total-N %	b) Total-N — Extraktiv-N %	Extraktiv-N absolut %	Extraktiv-N % von Total-N
1	Rind	3,19	3,04	0,15	4,7
		3,18	3,03	0,15	4,7
		3,26	3,02	0,24	7,3
2	Rind	3,35	2,52	0,83	24,8
		3,35	2,52	0,83	24,8
		3,32	2,50	0,82	25,0
		3,36	2,50	0,86	25,6
3	Rind	2,44	2,16	0,28	11,5
		2,39	2,10	0,29	12,1
4	Rind	3,21	2,45	0,76	23,7
		3,22	2,51	0,71	22,1
		3,21	2,47	0,74	23,1
		3,25	2,44	0,81	25,2
5	Kaninchen	2,62	2,47	0,15	5,8
		2,78	2,52	0,26	9,3
		2,72	2,46	0,26	9,6
6	Kaninchen	2,31	2,15	0,16	6,9
		2,34	2,16	0,18	7,7
		2,30	2,20	0,20	8,7
		verloren	2,17	—	—
7	Kaninchen[1]	2,65	2,58	0,07	—
		2,60	2,59	0,01	—
8	Mensch	3,74	3,43	0,31	8,3
		3,68	3,37	0,31	8,4

Ein Blick auf die Tabelle zeigt sofort, daß die Mikrobestimmung ebenso gute Werte liefert wie eine Makrobestimmung nach Kjeldahl. Die größte Differenz zwischen den verschiedenen Bestimmungen der einzelnen Blutsorten betrug, und zwar nur einmal, 0,07 %. Und wir bemerken ausdrücklich, daß sämtliche Versuche angeführt worden sind. Zwar findet man bisweilen — zweimal — bei der Berechnung des Extraktiv-N etwas größere Differenzen. Hier sind aber, wie ersichtlich, die absoluten Werte derartig gering, daß sogar sehr unbedeutende Differenzen sich unverhältnismäßig stark geltend machen. Es ist weiter zu erwähnen, daß die einzelnen Versuche von Total-N und Extraktiv-N doch nicht, wie angeführt,

[1]) Vergiftet. Blut nach dem Tode aus der V. jugularis.

miteinander korrespondieren; sie sind im Gegenteil bei denselben Blutsorten willkürlich zusammengestellt. So ist z. B. im Versuch 1 der höchste Wert des Total-N mit dem geringsten Total-N — Extraktiv-N-Wert zusammengestellt. Trotzdem wurde hier für Extraktiv-N 0,24 % gegen 0,15 % in den übrigen zwei Versuchen gefunden. Erst wenn man den N = 100 setzt, tritt der Unterschied unverhältnismäßig stark hervor. Selbst wenn man nur diese letzteren Werte berücksichtigen will, werden die Differenzen durch Doppelbestimmungen ausgeglichen. Wir postulieren demzufolge, daß das Verfahren nicht allein annähernde, sondern exakte Resultate liefert.

Dies geht auch aus dem Vergleich mit dem Makro-Kjeldahl hervor. Im Versuch 4 wurden nach der Mikromethode 3,21 % bis 3,25 % N gefunden. In zwei Analysen nach Makro-Kjehldahl wurden 3,17 % und 3,20 % gefunden.

Im Versuch 3 wurden 2,42 % Total-N gefunden, was einem Eiweißgehalt von 14,98 % (N × 6,25) entspricht. Nach der Mikromethode wurden 16,49 % feste Blutbestandteile (vgl. Bang, l. c.) und 7,32 % Hämoglobin gefunden. Außer Eiweiß enthält das Blut also 1,5 % andere Verbindungen (wenn aller N als Eiweiß berechnet wird). Außer Hämoglobin enthält das Blut 7,66 % Eiweiß unter derselben Voraussetzung.

Schließlich möchten wir noch einen Versuch anführen, in dem die zur Extraktion des Extraktiv-N nötige Zeit festgestellt wurde, ein Versuch, der zugleich die Brauchbarkeit der Methode sehr überzeugend zeigt.

Tabelle III.

Zeit der Extraktion mit Salzlösung	a) Total-N %	b) Total-N — Extraktiv-N %	Extraktiv-N %
—	2,88	—	—
—	2,82	—	—
15 Min.	—	2,77	0,08
30 „	—	2,64	0,21
45 „	—	2,57	0,28
1 Std.	—	2,55	0,30
1 „ 30 Min.	—	2,60	0,25
2 „	—	2,51	0,31
3 „	—	2,58	0,27

Die Versuche, Tabelle II, zeigen außerdem, daß der Gehalt des Blutes an Total-N sowie an Extraktiv-N sogar unter physiologischen Verhältnissen recht variabel ist. Es wird eine interessante und bequem durchführbare Aufgabe sein, diese Verhältnisse experimentell näher zu studieren. Solche Versuche sind schon im hiesigen Institute in Angriff genommen. Die Ergebnisse sollen später mitgeteilt werden.

Analytische Belege.

Vers. Nr.	Blut von	Blut abgewogen mg	n/10-HCl ccm	n/100-Thio-sulfat ccm	N gefunden mg	N %
1	Rind	a) 106,5	3	5,75	3,395	3,19
		93,5	3	8,15	3,059	3,26
		115,5	3	3,75	3,675	3,18
		b) 101,0	3	8,04	3,074	3,04
		82,0	2	2,25	2,485	3,03
		94,0	3	9,70	2,842	3,02
2	Rind	a) 181,5	5	7,27	6,082	3,35
		136,0	4	7,40	4,564	3,35
		136,5	4	7,62	4,533	3,32
		135,5	4	7,46	4,557	3,36
		b) 142,8	4	14,28	3,601	2,52
		159,0	3	1,34	4,012	2,52
		135,5	3	5,76	3,394	2,50
		165,5	4	10,42	4,141	2,50
3	Rind	a) 162,8	3	1,66	3,973	2,44
		155,2	3	2,71	3,820	2,39
		b) 149,4	3	6,66	3,267	2,10
		141,5	3	8,77	2,972	2,10
4	Rind	a) 205,5	5	2,20	6,692	3,21
		134,5	4	9,00	4,343	3,22
		127,8	3	0,68	4,100	3,21
		118,2	3	2,50	3,850	3,25
		b) 115,2	3	9,82	2,825	2,75
		162,8	4	9,87	4,218	2,01
		120,3	3	8,88	2,957	2,46
		135,3	3	6,60	3,276	2,44
5	Kaninchen	a) 73,0	2	6,35	1,911	2,62
		80,0	2	4,07	2,230	2,78
		88,5	2	2,83	2,404	2,72
		b) 102,0	2	2,00	2,520	2,47
		113,5	3	9,52	2,865	2,52
		88,0	2	4,55	2,167	2,46
6	Kaninchen	a) 130,5	3	8,42	3,021	2,31
		127,2	3	8,70	2,982	2,34
		138,5	3	7,28	3,180	2,30

Vers. Nr.	Blut von	Blut abgewogen mg	$^{n}/_{10}$-HCl ccm	$^{n}/_{100}$-Thiosulfat ccm	N gefunden mg	N %
6	Kaninchen	b) 132,5	3	9,70	2,842	2,15
		132,0	3	9,65	2,849	2,16
		140,2	3	7,78	3,111	2,20
		143,8	3	7,70	3,120	2,17
7	Kaninchen	a) 136,2	3	4,24	3,606	2,65
		144,4	3	3,65	3,689	2,60
		b) 126,0	3	6,81	3,247	2,58
		127,2	3	6,47	3,294	2,59
8	Mensch	a) 101,0	3	3,02	3,774	3,74
		76,2	3	9,95	2,807	3,68
		b) 87,7	3	8,51	3,009	3,43
		90,0	3	8,34	3,032	3,37

Über die Bestimmung der wahren Blutreaktion mittels der elektrischen Methode.

Von

A. P. Konikoff.

(Aus dem Laboratorium der Klinik des Morosowschen Institutes zur Erforschung der Krebsgeschwülste, Moskau.)

(Eingegangen am 29. April 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Die elektrometrische Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration ist für die Mehrzahl der gewöhnlichen physikalisch-chemischen Messungen genügend genau und einfach in ihrer Technik; dieselbe Methode läßt aber bei ihrer Anwendung auf die Flüssigkeiten des tierischen Organismus wegen der Unbeständigkeit und der viel komplizierteren Zusammensetzung der letzteren gerade in bezug auf Präzisität der Resultate sehr viel zu wünschen übrig. Diese zwei Faktoren: die Unbeständigkeit und Kompliziertheit der Zusammensetzung, spielen speziell beim Blute eine große Rolle; denn einerseits ist die Verbindung des Sauerstoffes und der Kohlensäure des Blutes mit den anderen Bestandteilen desselben eine sehr lose, anderseits aber sind es hauptsächlich der Sauerstoff und die Kohlensäure, die die Verschiedenheit der Resultate der nach der elektrometrischen Methode bestimmten Reaktion des Blutes bedingen.

Die Möglichkeit, daß eine gewisse Verschiedenheit zwischen der Reaktion des Plasmas einerseits und der der Formelemente anderseits besteht, sowie die Anwesenheit von proteolytischen Fermenten in den Formelementen des Blutes (was Abderhalden experimentell festgestellt hat), erschweren die Untersuchung in hohem Grade und machen die Resultate unbestimmt und ungenau.

Bis jetzt ist von den die Reaktion des Blutes beeinflussenden Ingredienzen nur die Kohlensäure Gegenstand eingehender Unter-

suchungen gewesen, und zwar haben sich damit hauptsächlich Höber und in den letzten Jahren auch Hasselbalch beschäftigt.

Indessen spielt bei der in der physiologischen Praxis üblichen Methode der Bestimmung der Reaktion des Blutes, da mit einer konstanten Menge von Wasserstoff gearbeitet wird, die Einwirkung der sich verflüchtigenden Kohlensäure eine verhältnismäßig geringe Rolle; um so mehr Bedeutung kommt aber dem andern Gase des Blutes, dem Sauerstoff, zu. Infolge der Dissoziation des Oxyhämoglobins befindet sich ein Teil dieses Gases in gelöstem Zustande im Blutplasma. Es ist aber jedem, der sich mit der physikalischen Chemie beschäftigt, bekannt, wie groß die depolarisierende Wirkung des Sauerstoffes einer zu untersuchenden Flüssigkeit auf die Größe des Potentials der sich in letzterer befindlichen Wasserstoffelektrode ist.

Daher muß die Untersuchung dieses Faktors unsere erste Aufgabe sein, und wir werden uns bemühen, Mittel und Wege zu finden, um seinen Einfluß auf die Reaktion des Blutes auszuschließen. Und erst wenn uns dies gelungen ist, können wir dazu übergehen, die anderen Faktoren, die die Reaktion des Blutes beeinflussen, zu untersuchen, nämlich die Kohlensäure und die eigene Acidität der Formelemente des Blutes.

Methodisches.

Um beim Studium des Einflusses des Sauerstoffes auf das Blut, die Spannung der Kohlensäure des Blutes auf gleicher Höhe zu erhalten, können wir entweder nach der Methode von Höber vorgehen, d. h. durch ein Elektrodengefäß mit Blut einen konstanten Strom einer Mischung von Wasserstoff und Kohlensäure von einer bestimmten Zusammensetzung durchleiten, oder aber wir können, wie die meisten Forscher es tun, mit einer geringen Menge von reinem Wasserstoff in einem Elektrodengefäße arbeiten, ohne denselben zu erneuern. Wir haben die letztere Methode gewählt, weil sie einfacher ist und weil man sich dabei mit einer ganz geringen Menge von Blut begnügen kann.

Wir bedienten uns der von Hasselbalch empfohlenen Schaukelmethode[1]), die darin besteht, daß ein ungefähr gleichgroßes Volumen von Blut und Wasserstoff in einem Elektrodengefäß durchgeschüttelt

[1]) Diese Zeitschr. 30, 1910.

wird und auf diese Weise eine richtige und konstante Verteilung der Kohlensäure zwischen den flüssigen und gasförmigen Phasen zustande kommt. Da das Blut dabei einen Teil seiner Kohlensäure, die in die Wasserstoffatmosphäre übergeht, verliert, wird dasselbe stärker alkalisch als vorher. Nach Hasselbalch nimmt bei diesem Verfahren die Konzentration der Wasserstoffionen um 20% ab. Um sich davon zu überzeugen und auch die Einwirkung der sich verflüchtigenden Kohlensäure auszuschließen, machte Hasselbalch folgenden Versuch: Er entfernte nach dem ersten Schaukeln das Blut aus dem Gefäße und brachte eine Portion frischen Blutes hinein, wobei er den alten, schon mit Kohlensäure gesättigten Wasserstoff in dem Gefäße ließ. Er empfahl speziell zu diesem Zwecke ein Elektrodengefäß von ziemlich komplizierter Konstruktion, das unserer Ansicht nach diesen Zweck nicht ganz erfüllt, weil es bis zu einem gewissen Grade das Vermischen der Flüssigkeiten doch zuläßt. Wir empfehlen daher ein Gefäß, das viel einfacher und zweckmäßiger ist, und das ermöglicht, mit ganz geringen Mengen von Blut zu arbeiten.

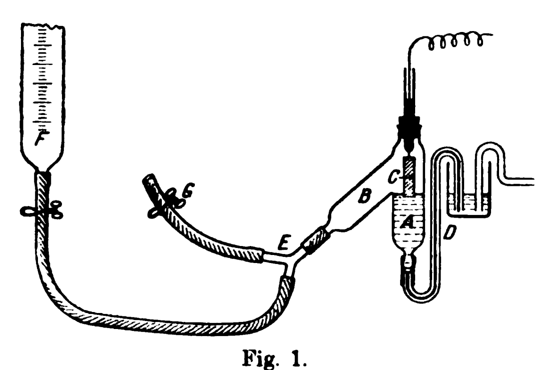


Fig. 1.

Der Apparat besteht aus zwei Teilen: dem Hauptteil *A* und dem Seitenteil *B*, die unter einem Winkel von 60° zueinander stehen; jeder der Teile faßt 2 bis 3 ccm. In den Hauptteil *A* wird von oben eine Platinelektrode *C* eingeführt und von unten ein gebogenes Rohr *D* eingeschoben. Der Seitenteil *B* ist vermittels eines Gummischlauches mit dem Gabelstück *E* verbunden; ein Ende des letzteren führt zur Bürette *F*, die mit Blut gefüllt ist, und sein anderes Ende ist mit der Wasserstoffquelle verbunden.

Vor allem wird die Bürette *F* von unten her mit Blut gefüllt, dann wird ihr Schlauch mit dem Gabelstück *E* verbunden, und es wird nun das Blut bis zur Abzweigung desselben hineingelassen, daraufhin wird während einer $^1/_2$ Stunde Wasserstoff durch den Apparat hindurchgeleitet, wobei das Röhrchen *D* mit seinem freien Ende ins Wasser tauchen soll. Dann wird der Seitenteil des Apparates, ohne daß das Rohr *D* aus dem Wasser herausgenommen wird, mit Blut gefüllt, das Blut wird in den Hauptteil *A* hinübergeleitet, und indem wir nun noch einmal die Klemme der Bürette *F* zudrücken, leiten wir das Blut auch

in das Röhrchen D, das wir jetzt aus dem Wasser herausnehmen können. Nun folgt das Schaukeln und es wird das Potential bestimmt. Um das Blut im Apparat zu erneuern, ohne den Wasserstoff daraus zu entfernen, bringen wir das gesamte Blut in den Hauptteil des Apparates, und dann erst lassen wir frisches Blut in den Seitenteil fließen. Bei diesem Vorgehen wird die alte Portion Blut, ohne mit dem frischen Blut in Berührung zu kommen, automatisch aus dem Apparat herausgedrängt.

Auf die Technik der Potentialbestimmung werden wir hier nicht eingehen, damit kann man sich in jedem Handbuch der physikalischen Chemie vertraut machen. Speziell für das Blut ist Neubergs Handbuch: „Der Harn sowie die übrigen Körperausscheidungen und Flüssigkeiten", Bd. II, 1911, zu empfehlen. Im großen und ganzen haben wir uns an die Methode von Sörensen, so wie er sie in seinen Enzymstudien beschreibt[1]), gehalten.

Aus dem Potential π, das wir durch Messung bestimmt haben, berechnen wir mit Hilfe der Formel, der sich Sörensen bedient hat:

$$p = \frac{\pi - 0{,}3377}{0{,}0577}$$

die Konzentration der Wasserstoffionen, wobei p den sogenannten Wasserstoffionenexponenten bezeichnet, d. h. p gibt die Potenz mit umgekehrtem Vorzeichen an, in die man 10 erheben muß, um die Anzahl von Grammionen Wasserstoff in einem Liter Flüssigkeit zu erhalten. Zu unseren Versuchen verwendeten wir venöses Hammelblut, das in einem kleinen, durch einen Glaspfropfen verschlossenen Gefäß mit Hilfe von Glasperlen defibriniert worden war.

Experimentelles.

Das Wesen der Einwirkung des im Blute gelösten Sauerstoffes auf die Größe des Potentials besteht darin, daß der Sauerstoff, der leicht nach der Platinelektrode diffundiert, sich mit dem Wasserstoff der letzteren verbindet und dadurch seine Spannung in der Elektrode herabsetzt. Die Platinelektrode, die, wenn auch nur in unbedeutendem Maße, mit Sauerstoff geladen ist, beginnt nun als Oxydationselektrode zu funktionieren. Da sich die Zerlegung des Oxyhämoglobins und die

---

[1]) Diese Zeitschr. 7.

Diffusion des Sauerstoffes durch die Elektrode mit einer bestimmten und nicht allzu großen Geschwindigkeit vollzieht, so wird, solange das Blut Oxyhämoglobin in sich einschließt, das Potential der Kette niedriger sein als es der eigentlichen Reaktion des Blutes entspricht[1]).

Es ist sehr leicht, sich von der depolarisierenden Wirkung des Sauerstoffes zu überzeugen, wenn man nur zu diesem Zwecke das Blut in dem Elektrodengefäß von Zeit zu Zeit schüttelt und nach dem jedesmaligen Schütteln das Potential bestimmt.

Aus der Tabelle I ist ersichtlich, daß das Potential nach jedem Schaukeln rasch sank, um nachher langsam wieder zu steigen, und zwar in dem Maße, als der von der Elektrode absorbierte Sauerstoff aufgebraucht und die normale Spannung des Wasserstoffes in der Elektrode wieder hergestellt wurde. Daß es sich hier um eine wirkliche Verbindung von Sauerstoff und Wasserstoff handelte, davon konnte man sich bei Beobachtung des Standes der Flüssigkeit leicht überzeugen; denn die Höhe der Flüssigkeitssäule im Elektrodengefäß nahm zu, d. h. das Volumen des Wasserstoffes nahm ab. Die Abnahme des Potentials unter der Einwirkung des jedesmaligen Schaukelns konnte man während 24 Stunden beobachten, und bei genügend niedriger Zimmertemperatur sogar länger. (Die Versuche in Tabelle I wurden bei einer Temperatur von 15° ausgeführt.) Schließlich wird das Potential vom Schaukeln unabhängig, wobei kein Wasserstoff mehr verbraucht wird; die Farbe des Blutes wird dunkelviolett und entspricht vollkommen dem reduzierten Hämoglobin. Als die wahre Reaktion des Blutes müssen wir natürlich diejenige ansprechen, die dem konstanten Potential

---

[1]) Merkwürdigerweise ist diesem Umstand von denjenigen Autoren sehr wenig Aufmerksamkeit geschenkt worden, die mit einer konstanten Menge von Wasserstoff experimentierten, ohne den gesamten Sauerstoff vermittels vorheriger Durchleitung von Wasserstoff oder eines Gemenges von Wasserstoff und Kohlensäure, wie es Höber getan hat, aus dem Blute zu entfernen. Ganz im Gegenteil äußerten Hasselbalch und Lundsgaard (diese Zeitschr. 38, 77, 1912) in ihrer letzten Arbeit die Ansicht, daß diese durch den Sauerstoff bewirkte Erniedrigung des Potentials ihre Ursache nicht in der Polarisation der Elektrode habe, sondern daß es sich um eine tatsächliche Änderung der Konzentration der Wasserstoffionen unter der Einwirkung des Sauerstoffes handle. Sie waren der Ansicht, daß eine vollständige Entfernung des Sauerstoffes nach Höber die Alkalescenz des Blutes nur „künstlich" erhöhe.

am Schlusse des Versuches entspricht. In dem Versuche, der in Tabelle I angeführt ist, haben wir, um die depolarisierende Wirkung des Sauerstoffes möglichst klar zu demonstrieren, das Schaukeln absichtlich in längeren Zeiträumen ausgeführt. Was die Methode anbetrifft, so verlangt sie natürlich eine Beschleunigung des Reduktionsprozesses des Oxyhämoglobins; denn andernfalls können, von großen Zeitverlusten abgesehen, solche Veränderungen im Blute vor sich gehen, daß eine Bestimmung seiner Reaktion nach 24 und mehr Stunden der Reaktion zu Beginn des Versuches nicht mehr entsprechen würde[1]).

Um die Reduktion des Oxyhämoglobins zu beschleunigen, schaukelten wir während 2 Stunden mit Pausen von 10 bis 20 Minuten zwischen dem jedesmaligen Schaukeln. Tabelle II demonstriert uns die Resultate dieses Versuches. Wir ersehen daraus, daß nach den ersten Malen des Schaukelns das Potential um nicht mehr als 5 Millivolt sinkt und daß dasselbe seine konstante Größe von 0,769 Volt sehr bald erreicht.

Wenn wir das Blut während des Schaukelns erwärmen, indem wir das Elektrodengefäß in warmes Wasser von 25 bis 35° stellen, können wir beobachten, daß die Reduktion äußerst rasch vor sich geht: nach 30 bis 40 Minuten bleibt das Potential schon konstant.

Der Versuch mit Hammelblutserum, der in der Tabelle III aufgezeichnet ist, zeigt uns die Bedeutung des Sauerstoffes der Erythrocyten ebenso klar wie der oben beschriebene. Da wir hier kein Oxyhämoglobin haben, erhalten wir schon nach einmaligem Schaukeln (während 2 Minuten) ein konstantes Potential von 0,795 Volt. Auf diese Weise wird es ganz klar, daß die von Hasselbalch empfohlene Schaukelmethode eben diese Beschleunigung des Reduktionsprozesses des Hämoglobins bedingt, und nicht etwa, wie Hasselbalch annahm, der richtigen

[1]) Daß solche Veränderungen tatsächlich vorkommen, können wir wiederum aus der Tabelle I ersehen: 15 Stunden nach dem zweiten Schaukeln finden wir, trotzdem noch nicht aller Sauerstoff aufgebraucht ist, 0,774 Volt, während wir nach dem vierten Schaukeln, nach dem das Potential schon konstant geblieben ist, nur noch 0,761 Volt, und nach 24 Stunden noch weniger, 0,760 Volt, haben. Offenbar handelt es sich hier um den Übertritt von sauren Stoffen aus den Formelementen des Blutes in das Plasma. Dieser Vorgang ist eine Folge der Hämolyse. Wir werden am Schlusse unserer Arbeit noch einmal auf diese Erscheinung zurückkommen.

Verteilung der Kohlensäure zwischen dem Blut und dem Wasserstoff dient.

Unsere Versuche erklären uns auch folgende Tatsache, die schon lange von Michaelis und Rona beobachtet worden ist, daß nämlich das Potential sich viel schneller einstellt, wenn die Elektrode nur ganz oberflächlich in das zu untersuchende Blut getaucht wird, oder noch besser, nur mit dem Schaum desselben in Berührung kommt, als bei tiefem Hineintauchen in dasselbe. Es scheint, daß im ersteren Falle eine wenn auch nur lokale, aber dafür vollständigere Reduktion des Oxyhämoglobins stattfindet, hauptsächlich aber die Bedingungen zur Sättigung der polarisierten Elektrode mit Wasserstoff viel günstigere sind als in letzterem Falle, wo der Elektrode auf einmal eine große Menge von Wasserstoff entzogen wird und der Zutritt neuen Wasserstoffes wegen des tiefen Eintauchens der Elektrode erschwert ist.

Nun können wir dazu übergehen, uns klar zu machen, welche Bedeutung bei unserer Methode der Bestimmung der Reaktion des Blutes der Kohlensäure zukommt.

Schon im Jahre 1903 hat Höber nachgewiesen, daß die Reaktion des Blutes sich nur ganz unbedeutend verändert, wenn verschiedene Gemenge von Kohlensäure und Wasserstoff durch dasselbe geleitet werden, vorausgesetzt, daß die Spannung der Kohlensäure in dem Gemenge die gewöhnliche Spannung der Kohlensäure im Blute unter physiologischen Bedingungen nicht übersteigt. Diese Spannung im Blute entspricht einer Atmosphäre plus 3 bis 6%[1]. Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Reaktion des Blutes durch Schütteln desselben mit einem gleichen Volumen von Wasserstoff mehr oder weniger verändert werde; nichtsdestoweniger hat Hasselbalch (l. c.) eine Verringerung der Konzentration der Wasserstoffionen um ca. 20% im Vergleich zur anfänglichen Konzentration festgestellt.

Da wir es für möglich hielten, daß in den Versuchen von Hasselbalch die Fehlerquelle in der Einwirkung des ungenügend reduzierten Oxyhämoglobins zu suchen sei, haben wir seinen Versuch noch einmal ausgeführt. Wir haben ihn aber nicht mit Blut, sondern zuerst mit einer 0,2%igen Lösung

[1]) Höber in Arch. f. d. ges. Physiol. 99, 1903.

von $NaHCO_3$ ausgeführt; denn bei der letzteren hätte sich der Einfluß der sich verflüchtigenden Kohlensäure in viel stärkerem Grade zeigen müssen, da diese Lösung eine 10 mal stärkere alkalische Reaktion hat wie das Blut, und zweitens enthält sie nicht solche „Puffer“[1]), wie z. B. Hämoglobin und Phosphate. Tabelle IV zeigt uns die Resultate dieses Versuches. Ähnlich wie Hasselbalch bestimmten auch wir, nachdem wir einen Teil der Flüssigkeit in dem Elektrodengefäß gut durchgeschüttelt hatten, das Potential; dann nahmen wir eine andere Portion Flüssigkeit, wobei wir den alten Wasserstoff entfernten, und bestimmten das Potential wieder.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, war die Konzentration der Wasserstoffionen in der ersten Portion der Lösung $NaHCO_3$ kleiner als in der zweiten Portion, und zwar in dem Verhältnis von $\frac{10^{8,49}}{10^{8,39}} = 10^{0,1} = 1,26$, und geringer als in der dritten und den darauffolgenden Portionen im Verhältnis von $\frac{10^{8,49}}{10^{8,34}} = 10^{0,15} = 1,4$.

Eine ebensolche Veränderung der Reaktion fand Hasselbalch für das Blut. Er fand folgendes Verhältnis zwischen der Reaktion der zweiten Portion Blut und der Reaktion der ersten Portion: $\frac{0,43}{0,34} = 1,27$. Offenbar ist diese Zahl viel zu groß. Eine viel kleinere Größe hat unser Versuch mit Hammelblut, wie Tabelle V zeigt, ergeben, und zwar:

$$\frac{10^{7,48}}{10^{7,44}} = 10^{0,04} = 1,10.$$

Auf diese Weise hat die Verringerung der Konzentration der Wasserstoffionen unter dem Einfluß der Verflüchtigung der Kohlensäure bei einmaligem Schütteln 10% nicht überschritten.

Wenn wir berücksichtigen, daß die Genauigkeit der elektrometrischen Messung der Reaktion des Blutes überhaupt 5% nicht übersteigt, so kann die von uns festgestellte Differenz in der Mehrzahl der Fälle ganz vernachlässigt werden, und

[1]) Puffer nennt Sörensen solche Stoffe, die die Einwirkung von Säuren oder Basen auf die Reaktion von Flüssigkeiten paralysieren. Die Rolle solcher Puffer spielen gewöhnlich die Salze schwacher Säuren, z. B. der Essigsäure, des sauren phosphorsauren Natrons usw.

es ist dann nicht nötig, die Arbeit durch diese Messungen, die viel Zeit und Material erfordern, zu komplizieren.

Wir wollen hier nicht auf alle Details der Frage der Verschiedenheit der Reaktion des defibrinierten Blutes und des Blutserums eingehen, sondern einen Versuch anführen, der uns direkt zeigt, daß die Erythrocyten tatsächlich einen gewissen Überschuß von Wasserstoffionen in sich schließen. Unser Versuch bestand in folgendem: Nachdem wir das konstante Potential des defibrinierten Blutes bestimmt hatten, unterwarfen wir das Blut im Elektrodengefäß durch 2 bis 3maliges Gefrieren und Wiederauftauen der Hämolyse und bestimmten dann seine Reaktion wieder. Tabelle VI zeigt nun, daß bei diesem Vorgang eine Erhöhung des Säuregehaltes von $10^{-7,75}$ auf $10^{-7,54}$, d. h. um 62 % zu konstatieren ist.

Die hier von uns festgestellte Tatsache ist von großer Bedeutung für die Physiologie und Pathologie des Blutes, denn sie beweist: 1. daß den Erythrocyten die Rolle zufällt, die im Organismus produzierten Säuren an diejenigen Stellen des Körpers zu transportieren, wo sie zur Ausscheidung gelangen sollen, nämlich zu den Lungen und Nieren; 2. daß an der Grenze zwischen Plasma und Erythrocyten eine gewisse Potentialdifferenz besteht, und daß die Größe dieser Differenz abhängig ist von der Differenz in der Konzentration der Wasserstoffionen im Plasma und in den Erythrocyten; da aber mit der Größe des elektrischen Potentials die Oberflächenspannung in engem Zusammenhang steht, so ist es erklärlich, daß die obenerwähnte Tatsache dazu dienen kann, die verschiedenen Bewegungserscheinungen der Formelemente des Blutes als elektrokinetische zu erklären.

Nachdem meine Abhandlung schon ins Deutsche übersetzt war, erschien in dieser Zeitschrift eine Arbeit von Hasselbalch, in der er selbst auf den auch von uns konstatierten Übelstand seiner Methode hinweist. Ich glaube aber, daß meine Arbeit, die sich eingehend mit der Frage der Bedeutung des Sauerstoffs bei der elektrometrischen Methode der Blutreaktionsbestimmung beschäftigt und außerdem die Frage der Acidität der Formelemente des Blutes behandelt, auch jetzt an Interesse nicht eingebüßt hat.

Tabelle I.

Defibriniertes Hammelblut.

Zeitraum nach dem nächsten Schaukeln	π	p
0	0,7050	6,36
4 Min.	0,7155	6,55
30 „	0,7416	7,00
1 Std. 30 Min. .	0,7521	7,18
Zweites Schaukeln		
0	0,7150	6,54
1 Std. 30 Min. .	0,7584	7,29
2 „ 30 „ .	0,7731	7,55
3 „ 30 „ .	0,7731	7,55
15 „	0,7742	7,56
Drittes Schaukeln		
0	0,7364	6,91
1 Std. 30 Min. .	0,7628	7,37
Viertes Schaukeln		
0	0,7471	7,10
30 Min.	0,7607	7,33
18 Std.	0,7607	7,33
Fünftes Schaukeln		
0	0,7607	7,33
24 Std.	0,7600	7,32
Sechstes Schaukeln		
0	0,7600	7,32

Tabelle II.

Das defibrinierte Hammelblut wurde innerhalb 2 Stunden 3 mal je 10 Min. dem Schaukeln unterworfen.

Zeitraum nach dem nächsten Schaukeln	π	p
Gleich nach dem 33 mal Schaukeln	0,7619	7,35
10 Min.	0,7640	7,39
2 Std.	0,7676	7,45
Schaukeln 12 Min.		
0	0,7640	7,39
15 Min.	0,7679	7,46
Schaukeln 12 Min.		
0	0,7649	7,40
15 Min.	0,7690	7,48
30 „	0,7690	7,48
Schaukeln 1 Min.		
0	0,7640	7,39
15 Min.	0,7690	7,48
30 „	0,7690	7,48

Tabelle III.

Hammelblutserum. Schaukeln 2 Min.

Zeitraum nach dem nächsten Schaukeln	π	p
0	0,7939	7,91
20 Min.	0,7950	7,93
40 „	0,7950	7,93
Schaukeln		
0	0,7950	7,93
15 Min.	0,7950	7,93

Tabelle IV.

0,2 %ige $NaHCO_3$-Lösung

Zeitraum nach dem nächsten Schaukeln	π	p
0	0,8281	8,50
30 Min.	0,8281	8,50
Schaukeln		
15 Min.	0,8275	8,49
Zweite Portion der Lösung		
0	0,8210	8,38
20 Min.	0,8217	8,39
40 „	0,8217	8,39
Schaukeln		
15 Min.	0,8217	8,39
Dritte Portion der Lösung		
0	0,8189	8,34
20 Min.	0,8189	8,34
Vierte Portion der Lösung		
0	0,8189	8,34
16 Std.	0,8189	8,34

Tabelle V.

Fortsetzung der Tabelle II mit einer frischen Portion von defibriniertem Blut nach 3maligem Schaukeln während 2 Stunden.

Zeitraum nach dem nächsten Schaukeln	π	p
0	0,7563	7,26
25 Min.	0,7621	7,37
Schaukeln 10 Min.		
0	0,7590	7,30
25 Min.	0,7642	7,39
12 Std.	0,7658	7,42
Schaukeln 10 Min.		
0	0,7617	7,35
25 Min.	0,7667	7,44
1 Std. 30 Min.	0,7667	7,44

Tabelle VI.

Defibriniertes Hammelblut.

Moment der Reaktionsbestimmung	π	p
Vor der Hämolyse	0,7849	7,75
30 Min. nach der Hämolyse . .	0,7730	7,54
2 Std. „ „ „ . .	0,7730	7,54

Über Blutlipoide und Phagocytose. I.

Von

B. Stuber.

(Aus der Medizinischen Klinik zu Freiburg i. Br.)

(Eingegangen am 30. April 1913.)

Nachdem durch die Forschungen der letzten Jahre die Bedeutung der Lipoide für die vitalen Erscheinungen immer mehr zutage getreten ist, und seitdem für den Chemismus der sich im Körper abspielenden Immunitätsvorgänge ihre führende Rolle immer mehr Wahrscheinlichkeit gewinnt, lag es nahe, auch ihren Einfluß auf die Lebensäußerungen der Leukocyten festzustellen.

Die grundlegenden Untersuchungen Hamburgers[1]) führten ja zu einer ganz neuen Erkenntnis in der Beurteilung physikalisch-chemischer Änderungen des Blutserums auf die phagocytäre Tätigkeit der Leukocyten; ich erinnere nur an den in der Entstehung seiner Wirkungsweise noch unklaren Einfluß des Calciumions auf die Phagocytose. Aber auch Hamburger weist schon in seinen Studien über den Effekt lipoidlösender Agenzien auf die lebende Zelle darauf hin, daß wohl auch Änderungen rein chemischer Natur im Zellgefüge für die Wirkung dieser Stoffe verantwortlich gemacht werden könnten.

Methode: Zur Bestimmung der Phagocytose dienten als Testobjekt Soorsporen. Schon Achard hat darauf hingewiesen, daß letztere sich für derartige Untersuchungen besonders gut eignen, da sie sich im gefärbten Blutpräparat als intensiv blaue Kugeln im Innern der Zelle deutlich abheben. Man muß nur Sorge tragen, daß die Soorkulturen keine oder wenig Mycelfäden treiben, da letztere für die Phagocyten wegen ihrer Größe unangreifbar sind und so zu viel zu niedrigen Werten führen können. Ich habe diesen Übelstand dadurch vermieden, daß ich

---

[1]) Hamburger, Physikalisch-chemische Untersuchungen über Phagocyten. Wiesbaden 1912.

zu dem Nährboden (Glycerinagar) $^1/_2{}^0/_0$ wasserlösliches Eosin zufügte. Der Soor wächst dann fast nur durch Sporulation. Eine Soorkonzentration von 50 bis 60 000 Sporen im Kubikmillimeter (Thoma-Zeißkammer) erwies sich am geeignetsten; die Aufschwemmung der Soorsporen geschah in künstlichem Serum (NaCl 7,5, Natr. citric. 6,0, Aq. dest. ad 1000,0). Für die Versuche in vitro wurde Blut vom Menschen, für die in vivo wurden Katzen, selten Kaninchen, verwandt.

Es wurde nun folgendermaßen verfahren: In kleine Zentrifugengläschen, deren Spitze capillar ausgezogen war, wurde jedesmal 0,1 ccm künstliches Serum, 0,1 ccm artgleiches Serum oder 0,1 ccm gesättigte wässerige Albuminlösung, 0,03 ccm Sooraufschwemmung und 0,03 ccm Blut zugefügt. Das ganze wurde gut gemischt und $^3/_4$ Stunden (soweit in den Protokollen keine andere Zeit angegeben ist) im Brutschrank bei 37° gelassen. Danach wurde 1 Minute bei 800 Umdrehungen zentrifugiert, das capillare Ende der Gläschen, in dem sich die Erythrocyten abgesetzt hatten, abgefeilt und die darüber befindliche Leukocytenschicht auf den Objektträger ausgeblasen und nach Leishmann gefärbt. Es wurden dann jedesmal in 200 Leukocyten die darin befindlichen Soorsporen gezählt. Der Quotient $\frac{\text{Zahl der Soorsporen}}{\text{Zahl der Leukocyten}}$ wurde phagocytärer Index genannt.

Der Zusatz von artgleichem Serum resp. Ovalbumin, bezweckte zunächst eine Verdünnung des Gemisches, um das sonst leicht eintretende Zusammenkleben der Leukocyten zu verhindern. Es bestand zuerst die Absicht, die Versuche mit durch isotonische Salzlösung gewaschenen, vollkommen vom Serum befreiten Leukocyten nach den Vorschriften Hamburgers und Wrights auszuführen. In den zahlreichen hierzu angestellten Vorversuchen waren die Resultate jedoch nicht befriedigend. In sämtlichen Versuchen trat eine deutliche Schädigung der Phagocytose auch durch isotonische Salzlösungen ein. Auch nach raschem Zurückbringen in das ursprüngliche Serum trat eine vollständige Erholung nicht mehr ein. Das Eiweißmilieu scheint danach Bedingung zu sein, um physiologische Daten zu erhalten. Es wurde dabei auch die Beobachtung gemacht, daß vor allem die menschlichen Leukocyten gegen Temperaturerniedrigung sehr empfindlich sind. Nachdem jedes Herabgehen unter die Körpertemperatur streng vermieden wurde, auch die Zentrifuge wurde auf dieser Temperatur gehalten, waren die Resultate besser, aber keineswegs gleichwertig mit denen der Kontrollversuche. Es erscheint deshalb die Ansicht nicht ganz unberechtigt, daß durch das Auswaschen der Leukocyten und der damit verbundenen Abkühlung unter Körper-

temperatur eine Verwischung des physiologischen Bildes der Phagocytose möglich ist. Es wurde unter diesen Umständen darauf verzichtet, da ein möglichst getreues Abbild der natürlichen Lebensvorgänge erreicht werden sollte.

Es zeigte sich, daß statt Serum ebensogut eine gesättigte wässerige Ovalbuminlösung als Verdünnungsmittel gebraucht werden kann. Bei beiden waren die Phagocytosewerte dieselben. Die Eiweißart scheint danach also gleichgültig zu sein, so daß vor allem die physikalische Komponente der Eiweißwirkung, nämlich das Zurückdrängen der Salzdiffusion aus dem Zellinnern in das Serum, in Betracht zu ziehen ist.

Phagocytärer Index mit Albumin	Kontrollindex mit Serum
1,20	1,11
0,98	0,99
1,10	0,96
1,30	1,18
0,89	0,95

Die geringen Differenzen liegen innerhalb unvermeidlicher Fehlergrenzen der Methode.

Die Lipoide, Cholesterin und Lecithin, gelangten als Emulsionen in Wasser, dargestellt nach den Angaben von Neubauer und Porges, zur Verwendung.

Als Lecithinpräparat diente das Lecithin. ovo puriss. Merck. Wenn auch nach den Untersuchungen von Bang angenommen werden muß, daß die Handelspräparate kein reines Lecithin, sondern Gemische von Phosphatiden darstellen, so war jedenfalls bei unseren Versuchen auffallend, daß nie durch Lecithin eine Hämolyse beobachtet wurde, und daß dasselbe fähig war, mit Cholesterin zu reagieren, beides Umstände, die für eine relative Reinheit des Präparates sprechen dürften.

Im folgenden sind die Protokolle der Cholesterin- und Lecithinversuche in vitro angegeben.

Cholesterinversuche in vitro.

Zur Verwendung gelangten 0,05 ccm einer 1 %igen, frisch dargestellten Cholesterinemulsion (siehe oben). Das Blut stammte von gesunden Menschen und wurde jedesmal direkt vor den Versuchen durch Stich in die Fingerbeere gewonnen. Die übrige Zusammensetzung und die Mengenverhältnisse sind hier, wie auch in allen folgenden Versuchen,

genau nach den früheren Angaben hergestellt. Von jedem einzelnen Versuche wurden immer Doppelbestimmungen gemacht. Die in sämtlichen Protokollen gegebenen Zahlen bedeuten die Mittelwerte.

Tabelle I.

Cholesterinversuche in vitro.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Cholesterinzusatz	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Cholesterinzusatz
1	0,340	1,145
2	0,510	0,995
3	0,310	0,600
4	0,600	1,300
5	0,410	0,700
6	0,300	0,800
7	0,450	0,900
8	0,700	1,200
9	0,300	0,800

Es ergibt sich eine Herabsetzung der Phagocytose durch Cholesterin um 40 bis 70%.

Die folgenden Versuche demonstrieren die Wirkung des Lecithins auf die Phagocytose. Entsprechend der obigen Versuchsanordnung wurden 0,05 ccm einer 1%igen Lecithinemulsion zugefügt.

Tabelle II.

Lecithinversuche in vitro.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Lecithin	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Lecithin
10	0,97	0,98
11	0,91	0,86
12	0,99	1,14
13	1,02	1,00
14	0,81	0,79

Eine wesentliche Beeinflussung der Phagocytose durch Lecithin findet hiernach nicht statt.

Von Interesse war es nun festzustellen, ob das Lecithin einen neutralisierenden Einfluß auf die hemmende Wirkung des Cholesterins bei der Phagocytose ausübt.

Dem Blute wurden 0,05 ccm einer 2%igen Lecithinemulsion und 0,05 ccm einer 1%igen Cholesterinemulsion hinzugefügt.

Tabelle III.

Cholesterin + Lecithinversuche in vitro.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Lecithin + Cholesterin	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Lipoidzusatz
15	1,02	1,06
16	1,41	1,52
17	0,89	0,97
18	1,32	1,21
19	0,40	0,35
20	0,69	0,67
21	0,54	0,52
22	0,69	0,60

Die oben geäußerte Vermutung hat sich damit bestätigt, es tritt eine vollkommene Neutralisation der hemmenden Cholesterinwirkung durch Lecithin ein.

Einer Erfahrung der Serologie folgend, daß Sera, wenn man sie auf ca. 70° kurze Zeit erhitzt, ihres Komplements verlustig gehen, wurde die Frage gestellt, ob es möglich ist, Lecithin durch Erhitzen gegen die hemmende Cholesterinwirkung unwirksam zu machen.

Es wurde zu diesem Zwecke eine 2%ige Lecithinemulsion $^1/_4$ Stunde auf 70° im Wasserbade erhitzt. Dann 0,05 ccm 2%ige Lecithin- mit 0,05 ccm 1%iger Cholesterinemulsion gemengt und dem Blutgemische zugefügt.

Tabelle IV.

Lecithin $^1/_4$ Stunde auf 70° erhitzt + Cholesterin.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Lecithin + Cholesterin	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Lipoidzusatz
23	0,13	0,41
24	0,10	0,38
25	0,17	0,52
26	0,32	0,58

Die oben gestellte Frage ist damit in positivem Sinne entschieden worden. Lecithin verliert durch kurzes Erhitzen auf 70° die Fähigkeit, die Cholesterinwirkung zu neutralisieren. Das Lecithin wird durch Erhitzen inaktiviert.

Dagegen ist diese Inaktivierung nicht mehr möglich, wie die folgenden Versuche zeigen, wenn man dem Lecithin vor

dem Erhitzen Gelegenheit gibt, sich mit dem Cholesterin zu binden.

Es wurden gleiche Mengen 2%ige Lecithinemulsion und 1%ige Cholesterinemulsion gemischt, dann 4 Stunden im Sonnenlicht stehen gelassen und das Gemisch dann $^1/_4$ Stunde auf 70° erhitzt.

Tabelle V.

Lecithin + Cholesterin vor dem Erhitzen auf 70° gemischt.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Lecithin + Cholesterin	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Lipoidzusatz
27	0,38	0,40
28	1,11	0,99
29	0,50	0,55
30	1,29	1,07

Das Resultat ist, wie oben bemerkt, vollkommene Neutralisation der Cholesterinwirkung durch Lecithin. Es ergibt sich fernerhin, daß eine Schädigung des Cholesterins durch Erhitzen nicht eintritt. Man könnte zwar noch an eine schützende Wirkung des beigefügten Lecithins denken. Es wurde deshalb noch ein Versuch mit auf 70° erhitztem Cholesterin unter Weglassung des Lecithins angestellt.

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit erhitztem Cholesterin	Phagocytärer Index Kontrollblut ohne Zusatz
31	0,29	0,92
32	0,36	1,00

Das Cholesterin wird also durch Erhitzen nicht beeinflußt, was auch a priori zu erwarten war.

Läßt man das Cholesterin kurze Zeit auf die Leukocyten einwirken und fügt erst nachträglich Lecithin hinzu, so tritt nur eine geringe Herabsetzung des phagocytären Index um 27 bis 35% (vgl. hierzu Tabelle I und V) ein, indem das noch verfügbare Cholesterin gebunden wird.

1%ige Cholesterinemulsion wirkt 15 Minuten im Brutschrank auf das Blutgemisch ein, dann wird 2%ige Lecithinemulsion hinzugefügt.

Tabelle VII.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut mit Lipoidzusatz	Phagocytärer Index Kontrollblut
33	0,8	1,10
34	0,7	1,09

Wir gehen nun zur Besprechung der Versuche in vivo über, die an Katzen ausgeführt wurden. Den Tieren wurde in leichter Äthernarkose Jugularis und Carotis freigelegt, dann, zur Bestimmung des phagocytären Kontroll-Index, Blut aus der Carotis entnommen. Die Injektion der Lipoidemulsion geschah hierauf in die Jugularis. Durchschnittlich erfolgte dann $^1/_2$ Stunde nach der Injektion erneut eine Blutentnahme aus der Carotis, um die Wirkung der Lipoide auf die Phagocytose festzustellen.

Die Lipoidemulsionen wurden in verschiedenen Konzentrationen von 0,5 bis 3$^0/_0$ angewandt. Hiervon wurden 35 ccm, 20 ccm oder 10 ccm injiziert. Vor Beginn der eigentlichen Versuche wurde festgestellt, daß die Äthernarkose, wenn sie 2 Stunden nicht überdauerte, keinen Einfluß auf die Phagocytose ausübt. Ebenso war ein Unterschied zwischen arteriellem und venösem Blut nicht zu finden.

Daß die durch die eingespritzten Emulsionen hervorgerufene Verdünnung des Blutes, resp. das zur Herstellung der Emulsionen verwandte destillierte Wasser keinerlei nachteilige Wirkung auf die Phagocytose hervorruft, geht aus der folgenden Tabelle hervor. Es wurden 2 Katzen je 20 ccm Aqua destillata intravenös eingespritzt.

Tabelle VIII.

Versuch Nr.	Phagocytärer Index Blut $^1/_2$ Stunde nach der Injektion von Aqua dest.	Phagocytärer Index Kontrollblut vor der Injektion
35	0,42	0,41
36	0,70	0,69

Wir beginnen mit den Cholesterinversuchen, die, wie auch alle folgenden Versuche, an Katzen in leichter Äthernarkose ausgeführt wurden. Zur Verwendung gelangten Cholesterinemulsionen von 0,5 und 1$^0/_0$ in Mengen von 20, 25 und 30 ccm. Die Bestimmung des phagocytären Index erfolgte jedesmal vor der Injektion und $^1/_2$ Stunde nach derselben.

Tabelle IX.

Cholesterinversuche in vivo.

Versuch Nr.	Tier	Phagocytärer Index Blut vor der Injektion	Injizierte Menge	Phagocytärer Index Blut $^1/_2$ Stunde nach der Injektion
37	Katze A	0,47	20 ccm 1 %iges Cholest.	0,03
38	Katze B	0,76	30 ccm 0,5 %iges Cholest.	0,08
39	Katze C	0,80	25 ccm 0,5 %iges Cholest.	0,10

Es ergibt sich eine enorme Herabsetzung der Phagocytose (um ca. 90%) durch Cholesterin, um so erheblicher, je stärker die angewandte Konzentration desselben war.

Es schien nun von Interesse, festzustellen, wie lange diese hemmende Wirkung des Cholesterins anhält. Es wurde zu diesem Zwecke Katze C nach 48 Stunden und Katze B nach 6 Stunden nochmals Blut entnommen. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle.

Tabelle X.

Dauer der Cholesterinwirkung.

Versuch Nr.	Tier	Dauer der Cholesterinwirkung	Phagocytärer Index
40	Katze C	48 Stunden	0,23
41	Katze B	6 Tage	0,40

Vergleicht man diese Zahlen mit den ursprünglichen Phagocytosewerten der Tiere in Tabelle IX, so stieg der Index bei Katze C um 16%, bei Katze B um 42%. Die durch Cholesterin hervorgerufene Schädigung der vitalen Funktionen der Leukocyten geht also sehr langsam zurück.

Um den Einfluß von Lecithin auf die Phagocytose in vivo festzustellen, wurden 2 und 3%ige Emulsionen verwandt, und zwar in Mengen von 20 und 30 ccm.

Aus folgender Tabelle zeigt sich, daß durch Lecithin in vivo, im Gegensatz zu den Versuchen in vitro, eine geringe Steigerung der Phagocytose um 7 bis 15% auftritt. Auf eine nähere Erklärung dieser Tatsache werden wir am Schlusse dieser Arbeit eingehen.

Tabelle XI.

Lecithinversuche.

Versuch Nr.	Tier	Phagocytärer Index ½ Stunde nach der Injektion	Menge des eingespritzten Lecithins	Phagocytärer Index Kontrolle vor der Injektion
42	Katze D	0,91	30 ccm 3%iges Lecithin	0,84
43	Katze E	0,82	30 ccm 2%iges Lecithin	0,75
44	Katze F	0,83	30 ccm 2%iges Lecithin	0,70

Analog den Versuchen in vitro werden nun Lecithin- und Cholesterinemulsionen gleichzeitig injiziert. Im ersten Falle war die Konzentration und Menge der Emulsionen gleich, je 10 ccm einer 1%igen Emulsion vor der Injektion im Reagensglas miteinander gemischt. In den übrigen Versuchen wurde das Lecithin in doppelter Menge angewandt, also 20 ccm 1%iges Lecithin und 10 ccm 1%ige Cholesterinemulsion, resp. 10 ccm 1%iges Lecithin und 10 ccm 0,5%ige Cholesterinemulsion. Auch wurden in diesen Versuchen die Emulsionen getrennt, aber direkt nacheinander eingespritzt.

Tabelle XII.

Cholesterin + Lecithinversuche in vivo.

Versuch Nr.	Tier	Phagocytärer Index, Blut ½ Std. nach Injektion	Menge und Konzentration der Lipoide	Phagocytärer Index vor der Injektion
45	Katze G	0,39	10 ccm 1%iges Lecithin 10 ccm 1%iges Cholest.	0,70
46	Katze H	0,79	20 ccm 1%iges Lecithin 10 ccm 1%iges Cholest.	0,81
47	Katze J	0,79	10 ccm 1%iges Lecithin 10 ccm 0,5%iges Cholest.	0,80

Es ist also auch in vivo eine völlige Neutralisation der hemmenden Cholesterinwirkung durch Lecithin möglich, wenn das Lecithin in doppelter Menge zum Cholesterin zugefügt wird.

Der Gedanke, daß das Lecithin auch einen länger dauernden Schutz gegen die hemmende Wirkung des Cholesterins verleihen könnte, war naheliegend. Es wurden zu diesem Zwecke Katzen 2 $^0/_0$ resp. 3 $^0/_0$ige Lecithinemulsionen injiziert und in verschiedenen Zeitabständen eine 1 $^0/_0$ige Cholesterinemulsion nachgespritzt.

Tabelle XIII.

Dauer der Lecithinschutzwirkung.

Versuch Nr.	Tier	Phagocyt. Index vor dem Versuch	Injizierte Lecithinmenge	Zeitabstand zwischen Lecithin- und Cholesterininjektion Std.	Injizierte Cholesterinmenge	Phagocytärer Index nach Cholesterininjektion
48	Katze K	0,75	30 ccm 2 $^0/_0$	24	30 ccm 1 $^0/_0$	0,48
49	" L	0,69	30 " 2 $^0/_0$	60	25 " 1 $^0/_0$	0,38
50	" M	1,09	35 " 3 $^0/_0$	24	20 " 1 $^0/_0$	0,99

Vergleichen wir mit diesen Werten diejenigen von Tabelle IX, so finden wir nach 24 und 60 Stunden eine Schutzwirkung des Lecithins von rund 30 und 35 $^0/_0$ bei annähernd gleichbleibender Konzentration und Menge des Cholesterins. Steigert man jedoch die Lecithinmenge, so erhöht sich auch die Schutzwirkung, wie aus Versuch Nr. 50 obenstehender Tabelle ersichtlich ist. Hier war noch nach 24 Stunden die Schutzwirkung des Lecithins so stark, daß das Cholesterin wirkungslos blieb.

Daß, genau wie in vitro, so auch in vivo, inaktiviertes Lecithin, 15 Minuten auf 70° im Wasserbade erhitzt, nicht mehr die Fähigkeit hat, gegen die Wirkung des Cholesterins zu schützen, geht aus der folgenden Tabelle hervor. Inaktiviertes Lecithin und Cholesterin wurden getrennt nacheinander eingespritzt.

Tabelle XIV.

Versuche mit inaktiviertem Lecithin.

Versuch Nr.	Tier	Phagocytärer Index vor dem Versuch	Menge und Konzentrat. des inaktivierten Lecithins	Menge und Konzentration des Cholesterins	Phagocytärer Index $^1/_2$ Std. nach der Cholesterininjektion
51	Katze N	0,72	10 ccm 1 $^0/_0$	10 ccm 0,5 $^0/_0$	0,06
52	" O	0,71	10 " 1 $^0/_0$	10 " 0,5 $^0/_0$	0,07

Es zeigt sich volle Cholesterinwirkung.

Überblicken wir das Resultat der vorstehenden Versuche, so ergibt sich: Fast völlige Hemmung der Phagocytose durch geringe Mengen von Cholesterin; diese Hemmung ist reversibel; Neutralisation der hemmenden Wirkung des Cholesterins durch Lecithin, Inaktivierung des Lecithins durch Erhitzen $^1/_4$ Stunde auf 70°, so daß ein Aufheben der hemmenden Wirkung des Cholesterins nicht mehr stattfindet, kurzdauernde Immunisierung gegen die Cholesterinwirkung durch Lecithin.

Fragen wir nun zunächst nach der Wirkungsweise des Cholesterins, so käme zweierlei in Betracht, entweder daß die Aufnahmegeschwindigkeit der Leukocyten herabgesetzt wird, oder aber, daß sie direkt in ihren vitalen Funktionen gelähmt werden. Experimentell ließe sich das dadurch entscheiden, daß man den Vorgang der Phagocytose zeitlich variiert. Dann müßte im ersten Falle, wenn es sich also nur um eine Herabsetzung der Aufnahmegeschwindigkeit durch Cholesterin handelte, bei genügend langer Dauer der Phagocytose ein Zeitpunkt kommen, bei dem der phagocytäre Index dieselbe Größe erreicht hätte wie im Kontrollblut ohne Cholesterinzusatz. Bei unserer Versuchsanordnung ließ sich dies jedoch nicht durchführen, da das Blut bei länger als 1 stündigem Verweilen im Brutschrank gerinnt. Es ist zwar möglich, durch stärkere Konzentration der zugefügten Natriumcitratlösung die Gerinnung zu verhindern, aber dann wird dadurch auch wieder die Phagocytose beeinträchtigt. Der zweite Weg wäre, mit isolierten Leukocyten, die durch mehrmaliges Waschen mit isotonischer Kochsalzlösung auch von jeglicher Spur Serum befreit wurden, zu arbeiten. Es wurde versucht, aber wie schon eingangs erwähnt, wurde auch dadurch die Phagocytose geschädigt. Es wurde deshalb, um Fehlerquellen zu vermeiden, von beiden Verfahren Abstand genommen. Es schien mir auch die oben diskutierte Frage viel einfacher zu beantworten. Betrachtet man die Phagocytosenwerte der Tabelle X, so fällt das lange Anhalten der Cholesterinwirkung auf. Noch am 6. Tage nach der Injektion finden wir eine Schädigung der Phagocytose um nahezu 50%. Diese intensive Schädigung der Zelle kann, wie ich glaube, nur durch eine Lähmung ihrer vitalen Funktionen erklärt werden. Sie erinnert an die Wirkung des Jodions. Nun wissen wir einerseits nach den Untersuchungen von

Overton[1]), daß Cholesterin, da wasserunlöslich, einer Diffusion durch die Lipoidmembran der Zelle nicht fähig ist, andererseits kann diese lähmende Wirkung des Cholesterins auf die Leukocyten nur durch direkte Beeinflussung des Zellstoffwechsels befriedigend erklärt werden. Möglich wäre, daß das Cholesterin durch andere Lipoide in seiner Löslichkeit Änderungen erfährt, wodurch eine Aufnahme ins Zellinnere stattfinden könnte. Diese gegenseitige Beeinflußbarkeit des Lösungsvermögens der Lipoide ist ja bekannt. Sicher aber kann das Cholesterin in wässeriger Emulsion in direkter Berührung mit der Zellmembran von dieser aufgenommen werden und von hier aus durch Veränderung seiner Löslichkeit im obigen Sinne, oder aber durch Eingehen einer dissoziierbaren Verbindung mit Teilen der Lipoidmembran dem Partialdruck entsprechend ins Zellinnere abwandern und damit zu Umlagerungen des Zellgefüges und Störungen der vitalen Funktion der Zelle führen. Mit der letzteren Annahme wird auch der langsame Rückgang der hemmenden Wirkung des Cholesterins verständlich.

Wir fassen also diesen lähmenden Einfluß des Cholesterins auf die vitalen Funktionen der Leukocyten im Sinne Hamburgers als eine negativ inotrope Wirkung auf.

Die neutralisierende Wirkung des Lecithins gegen den hemmenden Einfluß des Cholesterins läßt einen Vergleich mit den Vorgängen bei der Kobragifthämolyse zu. Daß in unseren Versuchen nicht eine Erhöhung der Phagocytose durch Lecithin in Betracht kommt, geht aus Tabelle II deutlich hervor. Die geringe Steigerung derselben im Tierexperiment, wie sie aus Tabelle XI ersichtlich ist, fällt kaum in die Wagschale. Sie ist vielleicht nur der Ausdruck einer erhöhten Organtätigkeit, da ja die Phosphatide auch als reine Nahrungsstoffe von Bedeutung sind. Es dürfte somit die Lecithinwirkung, als reiner Neutralisationsvorgang durch Bindung des Cholesterins aufgefaßt werden. Eine Cholesterin-Lecithinverbindung ist ja bekannt. Das geht auch aus den Versuchen der Tabelle V deutlich hervor. Durch den hierdurch geänderten Partialdruck des Serums ist nun auch die Möglichkeit des Austritts des Cholesterins aus der Zelle gegeben, wenn man den oben erörterten Standpunkt einer disso-

[1]) Overton, Handb. d. Physiol. von Nagel 1906/07.

ziierbaren Verbindung des Cholesterins mit Teilen der Lipoidmembran annimmt und damit eine Rückkehr der vitalen Funktionen der Zelle. Ferner können wir daraus entnehmen, daß die Bindung des Lecithins mit Cholesterin sehr fest sein muß, da sie sich gegen die sonst lipoidzersetzenden Einflüsse sehr resistent verhält. Daß das inaktivierte Lecithin keiner Neutralisation mehr fähig ist, dürfte auf die durch das Erhitzen bewirkte Zersetzung des Lecithins zurückzuführen sein, wodurch eine Bindung des Cholesterins nicht mehr möglich ist. Dagegen scheint der Abbau des Lecithins im Organismus relativ langsam zu erfolgen, was aus der lange dauernden Schutzwirkung des injizierten Lecithins gegen Cholesterin hervorgeht.

Wir gewinnen so auf Grund dieser Untersuchungen einen Einblick in die Bedeutung der Lipoide auch für die vitalen Funktionen der Leukocyten. Wir wissen ja gerade nach den neuesten Untersuchungen, daß die Lipoide schon unter physiologischen Bedingungen ein beträchtliches quantitatives Schwanken zeigen, eine Tatsache, die uns nun auch das Verständnis liefert für die Vielgestaltigkeit in den Lebensäußerungen der Leukocyten.

Über die Wirkung der in dieser Hinsicht noch interessierenden Cholesterinester wird später berichtet werden.

Die Acetonitrilreaktion.

Von

Fr. Port.

(Aus der Medizinischen Klinik in Göttingen.)

(Eingegangen am 30. April 1913.)

Vor einiger Zeit hat Reid Hunt eine Reaktion angegeben, durch die es möglich sein sollte, Störungen der Schilddrüsenfunktion biologisch nachzuweisen.

Er fand nämlich, daß sich weiße Mäuse viel widerstandsfähiger gegenüber Acetonitril erwiesen, wenn sie mit Schilddrüsensubstanz gefüttert wurden; dagegen zeigten weiße Mäuse, die mit Blut thyreoidektomierter Tiere gefüttert wurden, eine Herabsetzung dem Acetonitril gegenüber, die allerdings nicht stärker war, als sie bei Fütterung der Versuchstiere mit normalem Blut fast stets beobachtet wurde. Die mit dem Blute Basedow-Kranker gefütterten Mäuse boten ebenfalls eine Erhöhung der Resistenz gegenüber dem Acetonitril dar. Nach Reid Hunt[1]) besteht das Wesen der Reaktion darin, daß die CH_3-Gruppe aus der Verbindung $CH_3 . CN$ langsamer abgespalten und die Blausäurekomponente dadurch langsamer freigemacht wird. Die Höhe des Schutzes geht nach Reid Hunt — bei gleicher Menge der verfütterten Drüsensubstanz — ziemlich genau parallel mit dem Jodgehalt derselben. Später hat P. Trendelenburg[2]) versucht, mittels der Acetonitrilreaktion die Frage zu lösen, ob der Schilddrüse eine entgiftende Funktion zukommt. Bei seinen Versuchen ist er zum Teil zu anderen Resultaten als Reid Hunt gelangt; er fand, daß weiße Mäuse, die mit dem Blut thyreoidektomierter Katzen gefüttert wurden, eine erhöhte Resistenz gegen Acetonitril zeigten. Carlson und Wölfel[3]) konnten bei einer Serie von Mäusen, die sie mit

[1]) Reid Hunt und Atherton Seidel, Studies on thyroid I. The relation of Jodine to the physiological achivity of thyroid preparations. Bulletin Nr. 47. Hygienic Laboratory U. S. Public Health and Marine Hospital Service Washington 1909.

[2]) P. Trendelenburg, diese Zeitschr. **29**. Daselbst auch die übrigen Arbeiten von Reid Hunt aufgeführt.

[3]) Carlson und Wölfel, Journ. of Biolog. Chem. 7, 1910; zitiert nach P. Trendelenburg.

Schilddrüsenlymphe gefüttert hatten, keine Resistenzerhöhung gegenüber Acetonitril wahrnehmen. Ghedini[1]), der an der Klinik von v. Noorden klinische Untersuchungen mit der Acetonitrilreaktion vorgenommen hat, stellte in 9 Versuchen eine Erhöhung der Resistenz fest, und zwar verursachte eine Erhöhung 3 mal Blut von typischen Fällen von Basedow, 2 mal von chronischer Nephritis mit Urämie, je 1 mal von chronischer Nephritis, Adipositas dolorosa, Diabetes mit mäßiger Schilddrüsenvergrößerung, und schließlich eines Falles von starker Schilddrüsenvergrößerung. Dagegen bot eine Gruppe von Mäusen, die in 23 Versuchsreihen mit Blut verschiedenartiger Kranker gefüttert wurden, keine Änderung der Resistenz. Lussky[2]) fand zwar gleichfalls, daß Fütterung des Blutes von thyreoidektomierten Kaninchen die Acetonitrilresistenz der Mäuse auf das Doppelte erhöhte, doch gelangte er auf Grund von anderen Versuchen zu dem Schluß, daß der Acetonitrilreaktion keine Spezifität für den Nachweis der Schilddrüsensubstanz zukommt.

Von der Absicht ausgehend, an Kranken Störungen der Schilddrüsenfunktion mittels der Acetonitrilreaktion nachzuweisen, sah ich mich zunächst genötigt, Vorversuche betreffs der natürlichen Resistenz weißer Mäuse gegen Acetonitril vorzunehmen. Über diese möchte ich hier berichten, da sie m. E. dazu veranlassen müssen, den Wert der Acetonitrilreaktion anzuzweifeln.

Bereits Reid Hunt und P. Trendelenburg haben darauf hingewiesen, daß bei derartigen Versuchen gewisse Vorsichtsmaßregeln zu beachten sind, um einwandfreie Resultate zu erzielen. So sind die einheitliche Bezugsquelle und die gleichmäßige Ernährung von wesentlicher Bedeutung für die Genauigkeit der Reaktion auf Acetonitril; Änderung der Nahrung variiert die Resistenz der Tiere sehr erheblich. Ferner soll sich nach Trendelenburg die Dosis etwas mit der Jahreszeit ändern, und außerdem sollen die Tiere an verschiedenen Orten verschieden großen Dosen unterliegen. Hinsichtlich letzteren Punktes scheinen allerdings große Variationen zu bestehen. Reid Hunt fand in Washington als Grenzdose 0,25 mg Acetonitril pro Gramm Maus, Trendelenburg in Freiburg i. Br. 0,8 mg, und Ghedini in Wien 4,5 bis 5,5 mg. Letzterer fügt außerdem bei, daß die Tiere, falls diese Dosis nur um ein geringes erniedrigt wurde, in einem nicht konstanten Prozentsatz starben. Nach Trendelenburg ist bei Beobachtung der oben

[1]) Ghedini, Wiener klin. Wochenschr. **1911**.

[2]) Lussky, Americ. journ. of physiol. **30**. Ref. Kongreß-Centralbl. II.

angegebenen Vorsichtsmaßregeln die Grenzdose des subcutan injizierten Acetonitrils eine absolut scharfe; nie überlebte eines der Kontrolltiere die für den betreffenden Monat ermittelte minimale Letaldosis oder ging bei sonst subletalen Dosen zugrunde.

Bei meinen Versuchen habe ich natürlich die erwähnten Vorsichtsmaßregeln aufs genaueste beobachtet. Zu jedem einzelnen Versuch wurden nur Tiere vom gleichen Wurf verwendet, außerdem wurden sie — einzeln in Gläsern sitzend — ganz gleichmäßig gefüttert. Das verwendete Acetonitrilpräparat bezog ich von Merck in Darmstadt; um eventuelle Schwankungen in der Wirksamkeit des Präparates auszuschließen, ersetzte ich es nach einigen Monaten durch ein frisches. Einen Unterschied konnte ich jedoch nicht nachweisen. Die Verdünnungen des Acetonitrils wurden vor jeder Injektion frisch mit destilliertem Wasser hergestellt, die Injektion selbst wurde subcutan an der Schwanzwurzel ausgeführt, wobei ich besonders darauf achtete, kein Gefäß zu verletzen. Ich lasse nun die Protokolle folgen:

Protokolle.

Vers. Nr.	Gewicht g	Injizierte Acetonitrilmenge pro 1 g Maus mg	Resultat
		6. IV. 1911.	
1	22,2	1,25	tot nach ca. 22 Std.
2	22,5	1,50	„ „ 55 „
3	16,6	1,75	lebt
		7. V. 1911.	
1	14,2	0,75	lebt
2	13,1	0,80	„
3	14,2	0,85	tot nach 39 Std.
4	14,2	0,90	lebt
5	16,4	1,00	tot nach 35 Std.
6	12,1	1,50	„ „ 55 „
7	13,8	2,00	lebt
8	14,2	2,80	tot nach 25 Std.
		21. VI. 1911.	
1	10,5	0,75	lebt
2	14,2	0,80	„
3	14,2	1,00	tot nach 43 Std.
4	13,3	1,50	lebt
5	14,5	1,75	tot nach 25 Std.
6	13,1	2,00 (2%ige Lösung)	„ „ 18 „
7	13,1	2,00 (4%ige Lösung)	„ „ 24 „

Vers. Nr.	Gewicht g	Injizierte Acetonitrilmenge pro 1 g Maus cmm	Resultat
		29. VI. 1911.	
1	12,0	1,00	lebt
2	12,7	1,20	tot nach 12 Std.
3	13,7	1,40	lebt
4	12,5	1,50	"
5	15,0	1,60	tot nach 12 Std.
6	14,9	1,70	lebt
		5. VII. 1911.	
1	15,5	0,75	lebt
2	14,8	1,00	"
3	13,5	1,10	"
4	14,8	1,20	"
5	15,2	1,30	"
6	14,2	1,40	tot nach 9 Std.
7	14,3	1,50	lebt
8	13,8	1,70	"
		28. VII. 1911.	
1	15,5	2,50	lebt
2	17,1	3,00	tot nach 21 Std.
3	17,3	3,50	lebt
4	18,5	4,00	"
5	18,4	4,50	tot nach 72 Std.
6	18,3	5,00	" " 10½ "
7	18,5	5,50	lebt
		31. VII. 1911.	
1	23,0	43,5	tot nach 1 Min.
2	26,0	19,2	" " 35 "
		1. VIII. 1911.	
1	23,5	10,6	tot nach 1 Min.
2	23,0	10,6	" " 11 "
3	21,8	4,5	lebt
4	16,2	2,0	"
5	17,8	3,0	"
6	14,2	4,0	tot nach ca. 14 Std.
7	17,2	5,0	lebt
8	16,9	6,0	"
		3. VIII. 1911.	
1	13,6	5,0	tot nach 27 Std.
2	14,9	6,0	" " 27 "
3	14,5	7,0	" " 20 Min.
4	13,2	8,0	" " 27 Std.
5	14,7	9,0	" " 10 Min.
		6. X. 1911.	
1	18,5	2,0	tot nach 20 Std.
2	18,1	3,0	lebt
3	18,5	4,0	tot nach 24½ Std.
4	19,0	5,0	" " 25 "
5	18,2	6,0	" " 25 "

Vers. Nr.	Gewicht g	Injizierte Acetonitrilmenge pro 1 g Maus cmm	Resultat
		8. XI. 1912.	
1	15,6	1,0	lebt
2	14,6	2,0	„
3	18,7	3,0	tot nach ca. 16 Std.
4	15,0	4,0	„ „ 29 „
5	18,4	4,5	lebt
6	17,5	5,0	„
7	14,8	5,5	„
8	15,0	6,0	tot nach 29 Std.

Aus diesen Versuchen geht m. E. hervor, daß weiße Mäuse bereits normalerweise sehr verschieden empfindlich gegen Acetonitril sind. Manche erlagen schon sehr niederen Dosen, andere überstanden sehr hohe Dosen, nachdem sie ausgesprochene Vergiftungserscheinungen geboten hatten. Eine scharfe Grenzdosis ließ sich nicht auffinden. Aus diesen Gründen möchte ich den Wert der Acetonitrilreaktion zum Nachweis thyreogener Substanzen im Blute anzweifeln und habe deshalb von weiteren klinischen Untersuchungen, die ich bereits begonnen hatte, Abstand genommen.

Zusammensetzung des durch Wärme und durch Arbeit erzielten Schweißes.

Bemerkung zu der Mitteilung von Gaetano Viale: „Über die Ausscheidung von Natriumchlorid mit dem Schweiße bei anstrengender Arbeit“[1]).

Von

Angelo Pugliese.

(Eingegangen am 30. April 1913.)

G. Viale hat an die Accademia dei Lincei in der Sitzung vom 2. Februar 1913 die Ergebnisse von Untersuchungen mitgeteilt, die er, unter der Leitung von Prof. Agazzotti, über die Ausscheidung des Natriumchlorids mit dem Schweiße bei anstrengender Arbeit ausgeführt hatte. In dieser Mitteilung ist zu lesen: „In der Literatur existieren bisher keine Angaben über die Zusammensetzung des während der Arbeit abgesonderten Schweißes, es gibt solche nur in bezug auf den unter Einfluß der Wärme oder unter pathologischen Zuständen abgesonderten Schweiß“.

Und da Viale in dem während der Arbeit gesammelten Schweiß mehr Natriumchlorid vorfand als in dem unter dem Einfluß der Wärme abgesonderten, so kommt er zu der Schlußfolgerung, daß „der Schweiß, den die Hitze hervorruft, von dem durch Arbeitsleistung entstandenen zu unterscheiden ist“. So ist also Viale überzeugt, als Erster erkannt zu haben, daß der unter Einfluß von Wärme und der durch Arbeit gewonnene Schweiß eine verschiedene Zusammensetzung habe.

Wenn Viale seiner Pflicht gemäß sich der Mühe unterzogen hätte, die über diesen Gegenstand bestehende, übrigens nicht sehr ausgiebige Literatur mit etwas mehr Sorgfalt zu prüfen, so hätte er ersehen, daß ich in der weit verbreiteten Biochem. Zeitschr. — Bd. **39**, 133, 1912 — eine ausführliche Mitteilung über die Zusammensetzung des durch Wärme und Arbeit erzielten Schweißes des Pferdes veröffentlicht habe.

---

[1]) Atti della R. Accademia dei Lincei 22, 180, 1913.

In dieser Mitteilung, deren Titel schon keine Zweifel über ihren Inhalt aufkommen lassen kann, habe ich die großen Unterschiede in der Zusammensetzung des Schweißes je nach der Art und Weise seiner Gewinnung betont.

Wenn Viale diese Arbeit auch nur einer flüchtigen Prüfung gewürdigt hätte, so wäre ihm gewiß aufgefallen, daß der Unterschied zwischen dem durch Wärme und durch Arbeit gewonnenen Schweiße schon von mir hervorgehoben worden war, und er hätte daraus ersehen, daß außer dem Natriumchlorid auch der Trockenrückstand, der Aschengehalt, der Stickstoff, und infolgedessen auch das spezifische Gewicht und der osmotische Druck in dem während der Arbeit abgesonderten Schweiß stark zunehmen.

Erwiderung

von

E. Schreiber, Magdeburg.

(Eingegangen am 7. Mai 1913.)

Daß der Name des Herrn Dr. Lifschütz in dieser ersten vorläufigen Mitteilung fortgelassen ist, beruht auf einer persönlichen Abmachung zwischen Herrn Dr. Lifschütz und mir. Deshalb hat auch Herr Dr. L. meinen Namen in seiner voraufgegangenen Arbeit über den gleichen Gegenstand bei den in meinem Laboratorium gewonennen Resultaten nicht genannt. Es sollte noch eine gemeinschaftliche Arbeit von uns beiden erscheinen, die aber unterbleiben wird, da unsere Ansichten in bezug auf die Resultate vollkommen voneinander abweichen. Übrigens stimmt die Angabe des Herrn Dr. Lifschütz, daß der chemische Teil allein von ihm herrühre, nicht, ich habe zum mindesten gleichen Anteil daran, dagegen rührt der wichtigste Teil der Arbeit, die Durchblutungsversuche, wie ja auch Herr Dr. Lifschütz zugibt, von Herrn Dr. Lénárd und mir her; sie allein sind für unsere Auffassung entscheidend gewesen.

Zur Frage nach der Resistenz verschiedener Tiere gegenüber Arsen.

Von

M. Willberg.

Mit einem Anhang: Pathologisch-histologische Untersuchungen der Organe von J. J. Schirokogoroff.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Jurjeff.)

(Eingegangen am 1. Mai 1913.)

Die Pharmakologie des Arsens hat in letzter Zeit große Fortschritte gemacht durch die Darstellung und Erforschung des Atoxyls und Salvarsans. Die Literatur enthält sehr verschiedene und sich widersprechende Angaben über die minimale letale Dosis des Arsens bei ein und demselben Tiere. Andererseits ist die minimale letale Dosis des Arsens bei einigen Tieren überhaupt nicht festgestellt.

Unsere Aufgabe bestand in der Feststellung der Doses toleratae und der Doses letales bei einigen Tierarten.

Die Arsenliteratur ist bekanntlich sehr groß. Wir bringen an dieser Stelle nur kurze Literaturangaben und berücksichtigen nur diejenigen Daten, die uns am meisten interessieren, d. i. die minimalen tödlichen und die maximalen vertragbaren Arsendosen einiger höherer Tiere.

Nach Busscher[1]) beträgt die tödliche Dosis des Acid. arsenic. des Kaninchens per os eingeführt 0,025 g pro Kilogramm, bei Hunden hingegen 0,3 bis 0,4 g pro Kilogramm.

Brouardel[2]) bestimmte auf Grund seiner Versuche die tödliche Dosis der arsenigen Säure beim Kaninchen, und zwar beträgt sie intra-

---

[1]) L. Busscher, Arch. intern. de pharmacodyn. et de thérapie **10**, 415, 1902.

[2]) G. Brouardel, Etude sur l'arsenicisme. Thèse de Paris 1897.

venös injiziert 0,7 mg, subcutan 1 mg und per os 2 bis 3 mg, gerechnet pro 100 g des Kaninchens.

Nach demselben Autor beträgt die tödliche Dosis der arsenigen Säure bei Meerschweinchen subcutan 1,3 mg, intraperitoneal 1,6 mg, intrapleural 1 mg und per os 2 bis 3 mg, gerechnet pro 100 g des Körpergewichts; wobei der Tod bei hungernden Tieren viel früher eintrat als bei gefütterten. Salkowski[1]) fand, daß 0,01 g arsenige Säure das Kaninchen in 3 bis 6 Stunden tötet. Kleinere Dosen bewirken den Tod nach einigen Tagen.

Nach Rouyer[2]) sind 3 mg arsenige Säure pro Kilogramm des Kaninchens unbedingt tödlich, wobei der Tod regelmäßig nach 8 Stunden eintritt.

Nenski und Sieber[3]) fanden, daß 0,01 g Kal. arsenic. vom Kaninchen vertragen wird.

Kochmann[4]) bestimmte, daß beim Kaninchen 34 mg Arsen pro Kilogramm in Form von Salvarsan, intravenös eingeführt, als tödliche Dosis anzusehen ist, wogegen 4,56 bis 5,3 mg Arsen pro Kilogramm in Form von Kal. arsenic., intravenös eingeführt, das Kaninchen tötet.

Kunkel[5]) bestimmte die letale Dosis des Kal. arsenic. beim Hunde und fand, daß sie bei einer intravenösen Injektion 2 bis 3 mg, per os hingegen 0,03 g pro Kilogramm beträgt. Diesen Unterschied erklärt der Autor dadurch, daß ein Teil des Arsens im Darmkanal in unlösliches Schwefelarsen übergeht. Die Möglichkeit eines derartigen Überganges des Arsens in Schwefelarsen ist durch Hofmann[6]) festgestellt worden.

Fröhner[7]) gibt folgende minimale tödliche Arsenikdosen der Haustiere bei innerlicher Verabreichung an: Beim Hunde beträgt sie 0,1 bis 0,2 g, beim Pferde und kleinen Wiederkäuern 10 bis 15 g, bei Rindern 15 bis 30 g, bei Schweinen $^1/_2$ bis 1 g, bei Hühnern 0,1 bis 0,15 g und bei Tauben 0,05 g. Von Wunden aus sind viel kleinere Dosen tödlich. Für Pferde 2 g, für Hunde 0,02 g, für Schafe 0,2 g.

Nach unseren Versuchen[8]) besitzt der Igel eine bedeutende Resistenz dem Kal. arsenic. gegenüber. Er verträgt subcutan 0,01 g pro Kilogramm ohne Vergiftungserscheinungen. Dosen von 0,011 bis 0,014 g pro Kilogramm können von ihm auch vertragen werden. 0,015 g pro Kilogramm ist als sicher tödlich wirkende Dosis anzusehen.

---

[1]) Zit. nach A. Kunkel, Handb. d. Toxikologie. Jena 1899, I, S. 262.

[2]) Rouyer, Essai sur les doses toxiques et les contre poisons de quelques composés arsinieaux. Thèse de Nancy 1875.

[3]) M. Nenski und N. Sieber, zit. nach Loew, Arch. f. d. ges. Physiol. **32**, 111 bis 112, 1883.

[4]) M. Kochmann, Münch. med. Wochenschr. **1912**, 18.

[5]) A. Kunkel, Handb. d. Toxikol. Jena 1899, I. S. 262.

[6]) E. v. Hofmann, Wiener med. Wochenschr. **1866**, Nr. 10 u. 12.

[7]) E. Fröhner, Lehrb. d. Thierärztl. Arzneimittellehre. Stuttgart 1889. S. 262.

[8]) M. Willberg, diese Zeitschr. **48**, 163.

Eine Reihe von Autoren versuchte bei Tieren eine Arsengewöhnung zu erzielen. So gaben Danger und Flaudin[1]) einem Hunde im Verlauf von 9 Monaten Arsenik, und erzielten, daß der Hund zum Schluß 0,9 g Arsenik ohne schädliche Wirkung vertrug.

Hausmann[2]) versuchte bei Hunden und Hühnern eine Arsengewöhnung zu erzielen. Die Hühner besitzen nach Hausmann eine bedeutende natürliche Resistenz dem Arsenik gegenüber: 0,15 g pro Kilogramm per os ist als nicht unbedingt tödlich wirkende Dosis anzu sehen. Letztere ist bei Hühnern großen individuellen Schwankungen unterworfen. Eine Arsengewöhnung der Hühner war nur eine unbedeutende.

Bei Hunden erzielte der Autor eine Gewöhnung bis zu 0,06 g pro Kilogramm per os. Größere Dosen verursachen Erbrechen.

Cloetta[3]) erzielte bei Hunden per os eine Arsengewöhnung bis 0,41 g pro Kilogramm, wobei er eine lokale Immunität des Magendarmkanals beim Hunde annimmt. Dies begründet er damit, daß die Hunde subcutan diesem Gifte gegenüber empfindlich bleiben. Bei Kaninchen erzielte Cloetta eine Gewöhnung von 30 bis 38 mg Arsenik pro Kilogramm.

Doyen und Morel[4]) gaben einem Hunde von 10 kg 4 Monate hindurch 1 mg arsenige Säure. Einem anderen Hunde von 18 kg führten sie per os einmalig 18 g arsenige Säure ein. In beiden Fällen wurden keine Vergiftungserscheinungen beobachtet.

Aus diesen Literaturangaben ersehen wir, daß die minimalen tödlichen Dosen der arsenigen Säure der höheren Tiere keineswegs feststehen, da bei verschiedenen Autoren sich widersprechende Daten finden; widerspruchsvoll sind die Daten auch in betreff der Hunde und Kaninchen.

Der Übersicht wegen haben wir diese Daten am Schluß der Arbeit in eine Tabelle zusammengefaßt (vgl. Tabelle XI), um sie mit unseren Daten zu vergleichen.

Experimenteller Teil.

In unseren Versuchen benutzten wir Kaliumarsenit von Kahlbaum, das bei 100° konstant getrocknet, 3,04 % am Gewicht verlor. Die Lösungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung zubereitet und steril injiziert. Per os wurde Kaliumarsenit resp. arsenige Säure in Substanz oder auch in Lösungen

[1]) Zit. nach A. Taylor, Die Gifte. Köln 1863. II. S. 210.

[2]) W. Hausmann, Deutsche med. Wochenschr. 1903, Nr. 52 und Arch. f. d. ges. Physiol. 113, 327, 1906.

[3]) M. Cloetta, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 54, 196, 1906.

[4]) M. Doyen et A. Morel, Compt. rend. Soc. Biol, 58 II. 116 bis 117, 1906.

eingeführt. Die Versuchstiere wurden fast täglich gewogen. Der Kürze wegen verzichten wir hier auf die Angabe aller Versuchsprotokolle und geben nur einige Beispiele an. Die anderen Daten fassen wir übersichtlich in Tabellen zusammen.

Die pathologisch-histologischen Untersuchungen der Organe wurden von Priv.-Doz. J. J. Schirokogoroff ausgeführt und zum Schluß der Arbeit in einem Anhang zusammengefaßt.

Versuche mit Hunden.

Versuch 3.

a) 2. IV. 1912. Ein Hund von 11,45 kg Körpergewicht erhielt per os mit der Speise 0,03 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 0,345 g. Es wurden keinerlei Vergiftungserscheinungen beobachtet.

3. IV. Körpergewicht 11,38 kg. Appetit gut, keine Diarrhöe.

b) 5. IV. Körpergewicht 11,04 kg. Erhielt per os 0,04 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 0,456 g. In der Nacht wiederholtes Erbrechen. Die Exkremente normal gefärbt.

6. IV. Körpergewicht 11,00 kg } Appetitlosigkeit,
8. IV. „ 10,85 „ } keine Exkremente.
9. IV. „ 11,02 „ frißt, Exkremente normal.
10. IV. „ 11,40 „ hat sich erholt.

c) 27. IV. „ 11,35 „ 10h 51′ erhielt per os im Fleisch 0,05 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 0,57 g.

14h 40′ frißt Suppe.
15h 30′ Erbrechen.
19h leckt Milch.

28. IV. Körpergewicht 10,9 kg. Frißt, Exkremente normal.

d) 3. V. Körpergewicht 11,35 kg. 10h 15′ erhielt per os in Brot 0,06 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 0,68 g.

10h 30′ fraß noch ca. 100 g Brot.
18h 40′ Erbrechen.

4. V. Körpergewicht 11,1 kg Frißt, sonst normal.

e) 7. V. Körpergewicht 11,6 kg. 11h 55′ erhielt per os 0,2 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 2,32 g.

12h leckte ca. 250 g Milch.
17h 22′ Erbrechen.
18h Erbrechen.

8. V. Körpergewicht 11,52 kg. Keine Diarrhöe, frißt mit Appetit.

f) 10. V. Körpergewicht 11,3 kg. Erhielt 10h 40′ in Brot per os 0,4 g Acid. arsen. pro Kilogramm, im ganzen 4,52 g.

11h 35′ Erbrechen.
11h 52′ Erbrechen.

11. V. Körpergewicht 10,3 kg. Appetitlosigkeit, keine Diarrhöe.
24. V. Körpergewicht 10,10 kg. Exkremente normal gefärbt.

g) 31. V. Körpergewicht 10,6 kg. Erhielt 10h 43' subcutan in die rechte Seite der Bauchwand 0,007 g Kal. arsenic. pro Kilogramm, im ganzen 0,075 g.

11h 30' Erbrechen und Exkremente normaler Färbung.

12h 20' Diarrhöe.

13h Erbrechen. Liegt.

19h 30' leckt Wasser.

1. VI. Körpergewicht 9,75 kg. Am Morgen erbrochene Massen und flüssige, normal gefärbte Exkremente vorgefunden.

2. VI. Körpergewicht 9,8 kg. Frißt. Keine Diarrhöe. Empfindlichkeit der Injektionsstelle.

3. VI. Körpergewicht 9,85 kg. Geschwulst der Injektionsstelle.

8. VI. Körpergewicht 11,2 kg. Eitriger Absceß an der Injektionsstelle. Frißt wenig. Augenscheinlich krank.

10. VI. Körpergewicht 11 kg. An der Injektionsstelle eine handflächengroße Nekrose der Haut und des Unterhautgewebes. Der Boden der Wunde ist mit grünlichem Eiter bedeckt.

15. VI. Die Wunde hat sich gereinigt und fängt an zu granulieren.

30. VI. Die Wunde ist verheilt. Der Hund hat sich vollständig erholt.

Tabelle I.

Versuch Nr.		Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Hundes kg	Dosis pro 1 kg des Hundes g	Modus der Gabe	Resultat des Versuchs
1[1]	a)	2. III. 1911	23,60	0,0025 Kal. arsenic.	per os	Keine Vergiftungserscheinungen
	b)	3. III.	23,65	0,005 " "	" "	" "
	c)	4. III.	24,00	0,01 " "	" "	" "
	d)	5. III.	24,00	0,02 " "	" "	Appetitlosigkeit. Sinken des Körpergewichts.
	e)	8. III.	23,00	0,043 " "	per os (Sonde)	Nach 20 Min. Erbrechen. Appetitlosigkeit. Gewichtsabnahme.
	f)	16. III.	22,20	0,04 " "	per os	Nach 3½ Std. Erbrechen. Gewichtsabnahme.
	g)	22. III.	22,50	0,04 " "	per os (Sonde)	Nach 10 Min. Erbrechen. Diarrhöe. Appetitlosigkeit. Gewichtsabnahme.
	h)	26. III.	22,20	0,003 " "	subcutan	Diarrhöe. Speichelfluß. Nach 24 Std. Ödem an der Injektionsstelle.
	i)	27. III.	22,55	0,005 " "	"	Starke Diarrhöe. Speichelfluß. Starkes Ödem an den Injektionsstellen.
	k)	29. III.	22,30	0,01 " "	"	Nach 1 Std. blutige Diarrhöe. Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit. An den Injektionsstellen eine ausgebreitete Nekrose der Haut nebst dem Unterhautgewebe.
		5. IV.	20,00	—	—	Am 5. IV. getötet.

[1]) In dieser wie auch in den folgenden Tabellen ist ein jedes Tier mit einer Nummer bezeichnet, die einzelnen Arsengaben aber mit Buchstaben (a, b usw.). Die Gaben per os erfolgten meist in Substanz mit einem Vehiculum, nur wenn die Sonde zur Anwendung kam, wurden Lösungen eingeführt.

Tabelle I (Fortsetzung).

Versuch Nr.		Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Hundes kg	Dosis pro 1 kg des Hundes g	Modus der Gabe	Resultat des Versuchs
2	a)	17. III. 1911	9,15	0,03 Kal. arsenic.	per os	Gänzliche Appetitlosigkeit. Diarrhöe. Gewichtsabnahme.
	b)	26. III.	8,20	0,0037 „ „	subcutan	Nach 24 Std. Ödem an der Injektionsstelle.
	c)	27. III.	8,32	0,0072 „ „	„	Diarrhöe. Nach 24 Std. Ödem an den Injektionsstellen.
	d)	29. III.	8,30	0,014 „ „	„	Nach $1^1/_2$ Std. mehrfaches Erbrechen. Blutige Diarrhöe. Appetitlosigkeit. Ödem an den Injektionsstellen.
		31. III.	7,63	—	—	† nach ca. 36 Std.
3	a)	2. IV. 1911	11,45	0,03 Acid. arsenic.	per os	Keine Vergiftungserscheinungen
	b)	5. IV.	11,40	0,04 „ „	„ „	In der Nacht mehrfaches Erbrechen. Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit.
	c)	27. IV.	11,35	0,05 „ „	„ „	Nach 4 Std. 39 Min. Erbrechen. Gewichtsabnahme.
	d)	3. V.	11,35	0,06 „ „	„ „	Nach 8 Std. 25 Min. Erbrechen. Gewichtsabnahme.
	e)	7. V.	11,60	0,2 „ „	„ „	Nach 5 Std. 27 Min. Erbrechen.
	f)	10. V.	11,30	0,4 „ „	„ „	Nach 55 Min. Erbrechen. Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit.
	g)	31. V.	10,60	0,007 Kal. arsenic.	subcutan	Wiederholtes Erbrechen und Kotentleerungen. Gewichtsabnahme. Ödem mit nachfolgender Nekrose der Haut und des Unterhautgewebes an der Injektionsstelle. Erholte sich. (Lebt noch am 15. III. 1913.)
		1. VI.	11,20	—	—	
4	a)	3. V. 1911	23,75	0,05 Kal. arsenic.	per os	Nach 3 Std. 22 Min. mehrfaches Erbrechen.
	b)	7. V.	23,50	0,1 „ „	„ „	Nach 3 Std. 50 Min. mehrfaches Erbrechen.
	c)	10. V.	23,00	0,3 „ „	„ „	Nach $1^1/_4$ Std. mehrfaches Erbrechen. Gewichtsabnahme.
	d)	31. V.	20,20	0,01 „ „	subcutan	Nach 48 Min. wiederholtes Erbrechen. Ödem an der Injektionsstelle. † nach ca. 12 Std.
		1. VI.	18,25 (Gewicht der Leiche)	—	—	
5		24. V. 1911	8,20	0,01 Kal. arsenic.	subcutan	Starke Erregung. Erbrechen. Ödem an der Injektionsstelle. † nach ca. 12 Std.
6		13. XII. 1911	9,35	0,009 Kal. arsenic.	subcutan	Wiederholtes Erbrechen. Diarrhöe. Zittern. Ödem an der Injektionsstelle. † nach ca. 6 Std.
7		28. I. 1912	34,10	0,007 Kal. arsenic.	subcutan	Kotentleerung. Ödem mit nachfolgender Nekrose der Haut und des Unterhautgewebes an der Injektionsstelle.
		12. II.	33,00	—	—	Der starken eitrigen Nekrose wegen (Wunde 14 × 20 cm) am 12. II. getötet.
8		26. III. 1912	19,20	0,005 Kal. arsenic.	intravenös	Keine Vergiftungserscheinungen
		21. IV.	20,10	—	—	Wurde getötet.
9		1. IV. 1912	8,57	0,007 Kal. arsenic.	intravenös	Wiederholtes Erbrechen. Kotentleerung. Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit.
		23. V.	8,55	—	—	Erholte sich. Wurde getötet.
10		1. IV. 1912	10,52	0,008 Kal. arsenic.	intravenös	Wiederholtes Erbrechen. Blutige Diarrhöe. † nach ca. 9 Std.

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich ist, vertragen Hunde per os in Substanz 0,03 g Kalium arsenicosum oder Acidum arsenicosum pro 1 kg des Körpergewichts leicht. Letztere Dosis verursacht nur eine vorübergehende Appetitlosigkeit und ein relativ geringes Fallen des Körpergewichts.

0,04 g Kal. arsenicosum per os pro 1 kg des Hundes verursacht schon starke Vergiftungserscheinungen, bestehend in Erbrechen, Diarrhöe, Appetitlosigkeit und starker Abnahme des Körpergewichtes. Doch ist auch diese Vergiftung keine tödliche, und nach ungefähr 10 Tagen tritt vollständige Erholung ein.

Acidum arsenicosum, den Hunden per os in Substanz in Gaben von 0,04 bis 0,4 g pro 1 kg gegeben, verursacht nach 1 bis 8 Stunden Erbrechen, wobei keine Diarrhöe beobachtet wurde. Nach 1 bis 2 Tagen erholten sich die Hunde vollkommen. Daraus folgt, daß Hunde auf große, per os in Substanz eingeführte Dosen arseniger Säure mit Erbrechen reagieren und dadurch ihren Organismus vom größten Teil der eingeführten, schwer löslichen arsenigen Säure befreien.

Dem subcutan und intravenös eingeführten Kal. arsenic. gegenüber sind die Hunde gleich resistent. Dosen bis 0,007 g pro 1 kg sind nicht tödlich und rufen nur Erbrechen, Abnahme des Körpergewichts und bisweilen Diarrhöe hervor. Größere Dosen, subcutan oder intravenös eingeführt, wirken schon tödlich. Bei den subcutanen Injektionen des Kal. arsenic. wurden bei Hunden in der Regel große Nekrosen der Haut und des Unterhautgewebes beobachtet. Solche Nekrosen wurden ausschließlich bei Hunden beobachtet, kein einziges Mal bei anderen Tieren, die unter gleichen Bedingungen Arseninjektionen erhielten. Daraus folgt die Annahme, daß das Unterhautgewebe und die Haut des Hundes eine erhöhte Empfindlichkeit dem Arsen gegenüber besitzen.

Vergleichen wir die subcutane resp. intravenöse Kal. arsenic.-Dosis (0,007 g pro 1 kg) mit der innerlichen Dosis dieses Giftes (0,03 g pro 1 kg) des Hundes, so ersehen wir, daß der Hund per os ca. $4^1/_2$ mal mehr Arsen verträgt als subcutan.

Unsere letztere Beobachtung bestätigt vollkommen die Annahme Cloettas, daß der Hundemagendarmkanal eine gewisse lokale Arsenresistenz besitzt.

Versuche mit Katzen.

Versuch 14.

9. III. 1911. Kater von 2340 g Körpergewicht erhielt 13h 8′ subcutan 0,006 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,014 g.

16h 55′ Erbrechen, Harnentleerung.

20h 15′ Erbrechen.

10. III. Körpergewicht 2050 g. Appetitlosigkeit.

14. III. Körpergewicht 2200 g. Unbedeutendes Ödem an der Injektionsstelle.

18. III. Körpergewicht 2250 g. An der Injektionsstelle eine Verhärtung von ungefähr 3 cm im Durchmesser.

24. III. Körpergewicht 2330 g.

21. IV. Körpergewicht 2440 g. Wurde chloroformiert.

Sektion: An der Injektionsstelle im Unterhautgewebe eine bindegewebige Verhärtung. Die Leber ist gelblich gefärbt. Die Nieren haben in der Rindenschicht eine gelbliche Färbung; die Markschicht ist dunkler und rötlich.

Tabelle II.

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht der Katzen g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
15	9. III. 1911	1860,0	0,005	Erbrechen. Kotentleerung. Starke Erregung. Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit. Ödem an der Injektionsstelle.
	21. IV.	2020,0	—	Erholte sich. Wurde getötet.
13 a)	3. II. 1911	3550,0	0,005	Erbrechen. Kotentleerung. Appetitlosigkeit. Gewichtsabnahme. Ödem an der Injektionsstelle.
	22. II.	3900,0	—	Erholte sich gut.
13 b)	23. II.	3870,0	0,006	Erregung. Erbrechen. Speichelfluß. Harnentleerung. Keine willkürlichen Bewegungen.
	24. II.	3500,0	—	Gewichtsabnahme.
	25. II.	3470,0	—	† nach ca. 36 Std.
14	9. III. 1911	2340,0	0,006	Wiederholtes Erbrechen. Harnentleerung. Appetitlosigkeit. Gewichtsabnahme. Ödem an der Injektionsstelle.
	21. IV.	2440,0	—	Erholte sich. Wurde getötet.
12	28. I. 1911	2600,0	0,007	Erbrechen. Diarrhöe. Krämpfe. † nach ca. 12 Std.
11	19. V. 1910	3460,0	0,010	Erbrechen. Krämpfe. Gewichtsabnahme.
	20. V.	3250,0	—	† nach 19 Std.

Also vertragen die Katzen subcutan 0,005 bis 0,006 g Kal. arsenic. pro 1 kg, wobei in allen Fällen Erbrechen, Appetitlosigkeit und Gewichtsabnahme beobachtet wurde.

Dosen von 0,007 g Kal. arsenic. pro 1 kg, subcutan eingeführt, töten die Katzen in ca. 12 Stunden, wobei Erbrechen, Diarrhöe und Krämpfe beobachtet wurden. Bei nicht tödlichen Arsendosen wurde bei Katzen an der Injektionsstelle im Unterhautgewebe eine Verhärtung bindegewebiger Natur gefunden.

Versuche mit Kaninchen.

A. Subcutane Arsengaben.

Versuch 22.

29. III. 1911. 13h 52'. Kaninchen von 2400 g Körpergewicht erhielt subcutan 0,01 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,024 g.

30. III. Körpergewicht 2310 g. Appetitlosigkeit.
1. IV. " 2210 g.
4. IV. " 2270 g.
19. IV. " 2420 g.
4. VI. " 2570 g.
23. XI. " 3100 g. Wurde durch Entbluten getötet.

Sektion: Das Tier sehr gut genährt, reichliche Fettablagerung im Unterhautgewebe und in der Bauchhöhle. Die inneren Organe weisen keinerlei makroskopisch-pathologische Veränderungen auf.

Tabelle III.

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Kaninchens g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
16 a)	1. IV. 1910	2200,0	0,002	Gewichtsabnahme.
	2. IV.	2140,0	—	
16 b)	5. IV.	2180,0	0,005	Idem.
	28. V.	2380,0	—	Erholte sich.
17 a)	2. IV. 1910	1350,0	0,003	Gewichtsabnahme.
17 b)	5. IV.	1330,0	0,004	Idem.
17 c)	8. IV.	1280,0	0,006	Idem.
	28. V.	1370,0	—	Erholte sich.
18 a)	28. IV. 1910	1410,0	0,008	Gewichtsabnahme.
18 b)	4. V.	1450,0	0,009	Idem.
18 c)	19. V.	1560,0	0,012	Idem. Blutige Diarrhöe.
	20. V.	1360,0	—	† nach 26 Std. 40 Min.
19 a)	28. IV. 1910	1210,0	0,007	Gewichtsabnahme.
19 b)	4. V.	1245,0	0,010	Idem.
19 c)	19. V.	1320,0	0,015	Starke Gewichtsabnahme.
	20. V.	1150,0	—	Starke Diarrhöe. Klonische Krämpfe. † nach 24 Std. 5 Min.
23	31. III. 1911	1380,0	0,008	Gewichtsabnahme. Erholte sich.
	2. VI.	1470,0	—	

Tabelle III (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Kaninchens g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
21	29. III. 1911 30. III.	1850,0 1740,0	0,009 —	Gewichtsabnahme. † nach ca. 36 Std.
24	24. V. 1911 2. VI.	920,0 915,0	0,009 —	Gewichtsabnahme. Erholte sich.
20	24. V. 1910 26. V.	1030,0 950,0	0,010 —	Gewichtsabnahme. † nach ca. 36 Std.
22	29. III. 1911 1. IV. 23. XI.	2400,0 2210,0 3100,0	0,010 — —	Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit. Erholte sich. Wurde getötet.

Arsengaben per os.

Versuch 28.

2. IV. 1911. 13h 20′. Kaninchen von 1470 g Körpergewicht erhielt per os in einer Lösung 0,015 g Acid. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,0225 g.

3. IV. Körpergewicht 1390 g. Appetitlosigkeit.
18. IV. „ 1560 g. Hat sich erholt.
3. VI. „ 1700 g. Getötet durch Entbluten.

Sektion: In den inneren Organen keine makroskopischen, pathologischen Veränderungen gefunden. Ist trächtig.

Mithin vertragen die Kaninchen Kal. arsenic. in einer Dosis von 0,008 g pro 1 kg verhältnismäßig leicht. Dosen von 0,009 bis 0,01 g Kal. arsenic. pro 1 kg des Kaninchens sind als terminale Dosen anzusehen, entweder gehen die Kaninchen ein oder sie erholen sich vollkommen. So erhielt ein Kaninchen (Versuch 22) 0,01 g Kal. arsenic. pro 1 kg. Nach einer anfänglichen Gewichtsabnahme und Appetitlosigkeit erholte sich das Tier vollkommen und nahm nach 239 Tagen 700 g zu. Bei den subcutanen Kal. arsenic.-Injektionen wurden bei den Kaninchen im Unterhautgewebe an der Injektionsstelle nur sehr unbedeutende lokale Reizungserscheinungen beobachtet.

Acid. arsenic. dem Kaninchen per os in einer Lösung eingeführt, wird von ihnen in einer Dosis von 0,015 g pro 1 kg vertragen. Eine Dosis von 0,016 g pro 1 kg wirkt schon tödlich.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Kaninchens g	Dosis d. Acid. arsenic.[1]) pro 1 kg per os eingeführt g	Resultat des Versuchs
26	12. V. 1910 17. V. 2. VI.	1430,0 1145,0 1330,0	0,010 — —	Gewichtsabnahme. Abortus. Erholte sich. Wurde getötet.
27	19. V. 1910 2. VI.	2430,0 2570,0	0,015 —	Gewichtsabnahme. Erholte sich.
28	2. IV. 1911 3. VI.	1470,0 1700,0	0,015 —	Gewichtsabnahme. Erholte sich. Wurde getötet.
31	25. IV. 1911 27. IV.	1400,0 1340,0	0,016 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach 49 Std. 40 Min.
29	25. IV. 1911 28. IV.	1700,0 1630,0	0,018 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. Zittern. † nach ca. 60 Std.
25	5. V. 1911 10. V.	2740,0 2600,0	0,020 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. Zittern. † nach ca. 108 Std.
30	25. IV. 1911 26. IV.	1930,0 1680,0	0,020 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.

Bei subcutanen Kal. arsenic.-Gaben, wie auch bei innerlichen Acid. arsenic.-Gaben tritt der Tod unter folgenden Vergiftungserscheinungen ein: Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme, meistens entsteht eine schwere Gastroenteritis und nur zuweilen werden klonische Krämpfe beobachtet. Ein Unterschied besteht nur insofern, als arsenige Säure, die in einem zweimal größeren Quantum per os eingeführt wird, die Kaninchen in einem ca. zweimal größeren Zeitraum tötet, als das subcutan eingeführte Kal. arsenic. Dieser Unterschied erklärt sich erstens durch den Modus der Einführung dieses Präparates und zweitens durch die Geschwindigkeit der Resorption. Letztere ist im Magendarmkanal eine geringe.

Acid. arsenic., dem Kaninchen per os in einer Dosis von 0,01 g pro 1 kg eingeführt, kann einen Abort herbeiführen (vgl. Versuch 26).

[1]) Acidum arsenicosum wurde in einer Lösung mittels einer Sonde per os eingeführt.

Versuche mit Hasen.

Versuch 33.

22. XI. 1911. 17h 8' erhielt ein Hase von 1700 g Körpergewicht subcutan 0,008 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,014 g. Diarrhöe.

23. XI. Am Morgen tot vorgefunden.

Sektion: Gewicht der Leiche 1660 g. Die Gefäße des Herzens und des Magendarmkanals sind stark mit Blut injiziert. In der Schleimhaut des Magens diffuse Blutergüsse. Im Dünndarm punktartige Blutergüsse.

Tabelle V.

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Hasen g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
34	23. XI. 1911 23. XII.	1460,0 1505,0	0,005 —	Gewichtsabnahme. Erholte sich. Wurde getötet.
33	22. XI. 1911 23. XI.	1700,0 1660,0	0,008 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.
32	21. XI. 1911	2350,0	0,010	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.

Mithin besitzen die Hasen dem Kal. arsenic. gegenüber eine geringere Resistenz als die ihnen stammverwandten Kaninchen. Die Hasen vertragen 0,005 g Kal. arsenic. pro 1 kg und gehen bei einer Dosis von 0,008 g ein. Die Kaninchen hingegen vertragen 0,008 g und verenden bei 0,009 bis 0,01 g Kal. arsenic. pro 1 kg.

Versuche mit Mäusen.

Zu unseren Versuchen dienten 13 weiße und 4 graue Mäuse. Die Daten der Versuche ergeben sich aus Tabelle VI.

Hieraus sehen wir, daß die weißen und die grauen Mäuse bei subcutanen Einführungen gleich resistent dem Kal. arsenic. gegenüber sind. Sie vertragen 0,0156 bis 0,0176 g Kal. arsenic. pro 1 kg, wobei folgende Vergiftungserscheinungen beobachtet werden: Appetitlosigkeit, Diarrhöe und Gewichtsabnahme. Der Tod erfolgt bei 0,016 bis 0,018 g pro 1 kg, wobei obige Vergiftungserscheinungen relativ stärker ausgeprägt sind. Nach unseren Versuchen besitzen die Mäuse im Vergleich zu den anderen von uns untersuchten Tieren die größte Resistenz dem Kal. arsenic. gegenüber.

Tabelle VI.

Versuch Nr.	Körpergewicht der Maus g	Das subcutan eingeführte Kal. arsenic.-Quantum mg	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg der Maus g	Dauer des Versuchs Tage	Resultat des Versuchs
1[1]	27,5	0,40	0,0145	34	Erholte sich.
2	27,0	0,40	0,0148	95	" "
3	27,0	0,40	0,0148	95	" "
4	19,4	0,30	0,0155	123	" "
5	22,4	0,35	0,0156	53	" "
6	25,0	0,40	0,0160	—	† nach ca. 12 Std.
7	24,0	0,40	0,0167	—	† " 6 Std.
8	20,6	0,35	0,0170	118	Erholte sich.
9	17,5	0,30	0,0171	55	" "
10	19,9	0,35	0,0176	67	" "
11	16,0	0,30	0,0188	—	† nach ca. 12 Std.
12	17,5	0,40	0,0229	—	† " 4 Std.
13	15,3	0,40	0,0261	—	† " 4 "
14	12,5	0,20	0,0160	54	Erholte sich.
15	12,5	0,20	0,0160	—	† nach 5 Std.
16	17,0	0,30	0,0176	54	Erholte sich.
17	15,0	0,30	0,0200	—	† nach 6 Std.

Versuche mit Meerschweinchen.

Versuch 37.

1. XII. 1912. 13h 33′. Meerschweinchen von 620 g erhielt subcutan 0,01 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,006 g.

18h 10′ Diarrhöe.

2. XII. Am Morgen tot gefunden.

Sektion: Die Gefäße der inneren Organe sind stark mit Blut injiziert. Im Endokardium vereinzelte Blutergüsse. Muskatleber. Die Oberflächen des Querschnittes der Nieren sind gelbbraun. Die Markschicht ist stark abgegrenzt.

Tabelle VII.

Versuch Nr.		Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Meerschweinch. g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg des Meerschweinch. subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
36	a)	6. IV. 1910	655,0	0,008	Gewichtsabnahme.
	b)	28. IV.	650,0	0,004	Idem.
	c)	4. V.	670,0	0,006	Idem.
	d)	19. V.	670,0	0,009	Idem. Diarrhöe.
		2. VI.	700,0	—	Erholte sich.

[1]) Nr. 1 bis 13 weiße und Nr. 14 bis 17 graue Mäuse.

Tabelle VII (Fortsetzung).

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht des Meerschweinch. g	Dosis des Kal. arsenic. pro 1 kg des Meerschweinch. subcutan eingeführt g	Resultat des Versuchs
37	1. XII. 1912 2. XII.	620,0 600,0	0,01 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.
38	1. XII. 1912 2. XII.	675,0 640,0	0,011 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.
39	1. XII. 1912 3. XII.	710,0 675,0	0,012 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 36 Std.

Also verträgt das Meerschweinchen subcutan bis 0,009 g Kal. arsenic. pro 1 kg. Dosen von 0,01 g pro 1 kg sind als tödlich anzusehen.

Versuche mit Hühnern.

Versuch 43.

25. IV. 1911. 10h 43′ erhielt ein Huhn von 1660 g per os in Pillen 0,11 g Acid. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,18 g. Diarrhöe.

26. IV. Am Morgen tot gefunden.

Sektion: Gewicht der Leiche 1530 g. Melanose des Kammes. Die Gefäße sämtlicher innerer Organe sind stark mit Blut injiziert. Schwarze Pigmentablagerung im Mesenterium. Im Muskelmagen, unter der Hornschicht und im Darmkanal punktartige Blutergüsse. Die Leber enthält intensiv gelbbraun gefärbte Stellen.

Tabelle VIII.

Versuch Nr.	Dauer des Versuchs	Körpergewicht d. Huhnes g	Dosis des Acid. arsenic. pro 1 kg des Huhnes per os eingeführt g	Resultat des Versuchs
45	3. V. 1911 5. V.	1500,0 1350,0	0,066 —	Gewichtsabnahme. Appetitlosigkeit. Diarrhöe. Schwankender Gang. Melanose des Kammes. † nach ca. 36 Std.
44	3. V. 1911 5. V.	1900,0 1700,0	0,084 —	Idem. † nach ca. 36 Std.
42	25. IV. 1911	2210,0 2050,0	0,1 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. † nach ca. 10 Std.
43	25. IV. 1911	1660,0 1530,0	0,11 —	Gewichtsabnahme. Diarrhöe. Melanose d. Kammes. † nach ca. 12 Std.
40	28. III. 1911 3. IV.	1910,0 1570,0	0,131 —	Idem. † nach 6 × 24 Std.
41	28. III.	2000,0 1796,0	0,15 —	Idem. (Keine Melanose.) † nach ca. 12 Std.

Es ergibt sich, daß sämtliche Versuchshühner, die 0,06 bis 0,15 g Acid. arsenic. per os erhalten hatten, eingingen, und zwar an einer stark ausgesprochenen Gastroenteritis. Nach Hausmann vertragen die Hühner bis 0,15 g Acid. arsenic. pro 1 kg, und ist, wie dieser Autor beobachtet hat, die tödliche Dosis bei den Hühnern großen individuellen Schwankungen unterworfen. Wir können die von Hausmann angegebene Resistenz der Hühner dem Arsen gegenüber nicht bestätigen. Auffallend ist die bei Hühnern bei Arsenvergiftungen relativ schnell eintretende Melanose des Kammes.

Versuche mit Tauben.

Versuch 47.

a) 25. IV. 1911. 10^h 15′ erhielt eine Taube von 320 g per os in Pillen 0,094 g Acid. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,03 g.

11^h Entleerung eines Teils des Kropfinhaltes durch Brechbewegungen.

26. IV. Körpergewicht 305 g.

b) 2. XII. Körpergewicht 310 g. 13^h 42′ erhielt auf dieselbe Art 0,226 g Acid. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,07 g.

14^h 17′ Brechbewegung mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.

3. XII. Körpergewicht 275 g.

c) 31. I. 1912. Körpergewicht 320 g. 13^h 37′ erhielt per os 0,625 g Acid. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,2 g.

14^h 20′ Brechbewegungen mit Entleerung des Kropfinhaltes.

1. II. 1912. Körpergewicht 280 g.

d) 16. III. Körpergewicht 300 g. 12^h erhielt subcutan 0,012 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,004 g.

13^h 40′ liegt auf der Brust, die Augen geschlossen.

14^h 10′ Klonische Krämpfe.

16^h tot.

Sektion: Starke Injektion der Gefäße sämtlicher innerer Organe. Die Leber stark mit Blut gefüllt. Unter der Hornhaut des Muskelmagens einige diffuse Blutergüsse. In der Schleimhaut des Darmes punktartige Blutergüsse.

Folglich vertragen die Tauben per os große Mengen arseniger Säure. So erholte sich eine Taube nach 1,786 g Acid. arsenic. pro 1 kg per os eingeführt, wahrscheinlich nur dank der Fähigkeit, einen Teil des Arsens durch Brechbewegungen aus dem Kropfe zu entfernen. Unserer Ansicht nach ist die Resistenz der Tauben dem per os eingeführten Arsen gegenüber nur eine scheinbare. So ging eine Taube an 0,2 g Acid.

arsenic. pro 1 kg ein, vielleicht deswegen, weil keine genügenden Brechbewegungen eintraten (vgl. Versuch 49b). Andererseits sind die Tauben dem subcutan eingeführten Kal. arsenic. gegenüber relativ empfindlich. Eine Dosis von 0,012 g Kal. pro 1 kg, einer Taube subcutan eingeführt, tötete letztere in 4 Stunden (vgl. Versuch 47d).

Tabelle IX.

Versuch Nr.		Dauer des Versuchs	Körpergewicht der Tauben g	Dosis pro 1 kg der Taube g	Modus der Einführung	Resultat des Versuchs
46	a)	25. IV. 1911	320,0	0,06 Acid. arsenic.	per os	Brechbewegungen mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.
		26. IV.	285,0	—		
	b)	2. XII.	360,0	0,25 " "	" "	
		3. XII.	315,0	—		
	c)	31. I. 1912	330,0	0,91 " "	" "	
		1. II.	280,0	—		
	d)	16. III.	320,0	0,014 Kal. arsenic.	subcutan	Krämpfe. † n. 2 Std. 35 Min.
47	a)	25. IV. 1911	320,0	0,094 Acid. arsenic.	per os	Brechbewegungen mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.
		26. IV.	305,0	—		
	b)	2. XII.	310,0	0,226 " "	" "	
		3. XII.	275,0	—		
	c)	31. I. 1912	320,0	0,625 " "	" "	
		1. II.	280,0	—		
	d)	16. III.	300,0	0,012 Kal. arsenic.	subcutan	Krämpfe. † nach 4 Std.
48	a)	25. IV. 1911	310,0	0,13 Acid. arsenic.	per os	Brechbewegungen mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.
		26. IV.	280,0	—		
	b)	2. XII.	280,0	0,178 " "	" "	
		3. XII.	255,0	—		
	c)	31. I. 1912	270,0	0,37 " "	" "	
		1. II.	240,0	—		
	d)	28. II.	280,0	1,78 " "	" "	
		29. II.	230,0	—		
		16. III.	260,0	—		Wurde getötet.
49	a)	25. IV. 1911	310,0	0,161 Acid. arsenic.	per os	Brechbewegungen mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.
		26. IV.	295,0	—		
	b)	2. XII.	300,0	0,2 " "	" "	
		3. XII.	272,0	—		Diarrhöe. † nach ca. 12 Std.

Versuch mit einer Kreuzotter.

Versuch 50.

29. IV. 1911. Eine Kreuzotter von 77 g Körpergewicht. $10^h 35'$ erhielt subcutan 0,032 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,00025 g.

5. V. $13^h 55'$ erhielt subcutan 0,0065 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,0005 g.

10. V. $13^h 8'$ erhielt subcutan 0,013 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,001 g.

19. V. 11h 18′ erhielt subcutan 0,019 g Kal. arsenic. pro 1 kg, im ganzen 0,0015 g. 15h 30′ tot gefunden.

Sektion: Starke Rötung des Magendarmkanals.

Wie aus obigem Versuch ersichtlich, ist die Kreuzotter dem subcutan eingeführten Kal. arsenic. gegenüber relativ resistent: eine Dosis von 0,013 g pro 1 kg wird ohne sichtbare Vergiftungserscheinungen vertragen. Bei einer Dosis von 0,019 g pro 1 kg tritt ein schneller Tod ein.

Zusammenfassung.

Tabelle X.

Doses toleratae des Kalium arsenicosum und des Acidum arsenicosum bei verschiedenen Tieren.

Art der Tiere	Modus der Einführung	Dosis pro 1 kg des Tieres in Gramm:	
		Kalii arsenicosi	Acidi arsenicosi
Tauben	per os	—	1,786 [1]
	subcutan	weniger als 0,012	—
Mäuse	subcutan	0,0156—0,0176	—
Igel [2]	subcutan	0,01—0,014	—
Kaninchen	per os	—	0,015
	subcutan	0,008—0,01	—
Hunde	per os	0,03 [3]	0,03 [3]
	subcutan, intravenös	0,007	—
Meerschweinchen	subcutan	0,009	—
Katzen	subcutan	0,005—0,006	—
Hasen	subcutan	mehr als 0,005 und weniger als 0,008	—
Hühner	per os	—	weniger als 0,06
Kreuzottern	subcutan	0,012	—

Indem wir unsere Resultate (siehe Tabelle X) vergleichen, sehen wir, daß die verschiedenen Tiere eine sehr verschiedene Resistenz dem Arsen gegenüber besitzen. An erster Stelle

[1]) Bei den Tauben entstehen Brechbewegungen mit teilweiser Entleerung des Kropfinhaltes.

[2]) M. Willberg, diese Zeitschr. 48, 163.

[3]) Diese Dosen werden von Hunden ohne Erbrechen vertragen; größere z. B. 0,4 g Acid. arsenicos. pro 1 kg rufen Erbrechen hervor.

stehen hier die weißen und die grauen Mäuse, die widerstandsfähiger dem Arsen gegenüber sind, als alle anderen von uns zu Versuchszwecken gebrauchten Tiere. Dann folgen Igel, Kaninchen, Hunde, Katzen usw. Augenscheinlich spielt bei der Arsenresistenz die Größe des Tieres eine gewisse Rolle, denn es erweist sich, daß die kleineren Tiere fast ausnahmslos viel resistenter sind als die großen. Im Vergleich zu den Tieren ist der Mensch am empfindlichsten dem Arsen gegenüber. Diese Empfindlichkeit des Menschen hängt wohl von der hohen Entwicklung seines Nervensystems ab.

Die Hunde besitzen eine recht große Resistenz dem Arsen gegenüber: bei Dosen von 0,03 g Acid. arsenic. pro 1 kg, in den Magen eingeführt, sind keine sichtbaren Vergiftungserscheinungen zu beobachten. Dosen jedoch von 0,04 bis 0,4 g pro 1 kg rufen Erbrechen und Appetitverlust hervor. Doch erholen sich die Hunde hiervon sehr schnell.

Das Unterhautgewebe der Hunde ist den Kal. arsenic.-Injektionen gegenüber sehr empfindlich, indem zuerst an der Injektionsstelle ein Ödem mit nachfolgender Nekrose der Haut und des Unterhautgewebes entsteht. Derartige Nekrosen wurden in der Regel nur bei Hunden beobachtet und kein einziges Mal bei anderen Versuchstieren.

Bemerkenswert ist, daß die Kaninchen und die ihnen verwandten Hasen sich ganz verschieden den subcutanen Einführungen des Kal. arsenic. gegenüber verhalten: nämlich die Hasen sind diesem Gift gegenüber viel weniger resistent als die Kaninchen (siehe Tabelle X).

Die Tauben besitzen die Eigenschaft, die ihnen in den Kropf eingeführte arsenige Säure durch Brechbewegungen teilweise zu entfernen.

Bei Tauben, ebenso wie bei Hunden entsteht sehr leicht Erbrechen, wodurch große Arsengaben, per os eingeführt, bei diesen Tieren fast unwirksam sind.

Obwohl unsere Versuche mit einigen Tierarten, z. B. Hühnern, noch nicht abgeschlossen sind, so können wir doch nachweisen, daß zweifellos das Protoplasma einiger Gewebe verschiedener Tiere nicht gleich resistent dem Arsen gegenüber ist. Wodurch diese ungleiche Resistenz bedingt wird, ist im Augenblick schwer zu entscheiden.

Tabelle XI.

Die minimalen letalen Dosen des Acid arsenic. und des Kal. arsenic. der höheren Tiere nach verschiedenen Autoren.

Autor	Tierart	Modus der Einführung	Die tödliche Dosis des Kal. arsenic. resp. des Acid. arsenic. in Gramm gerechnet:	
			pro 1 kg	pro ganzes Tier:
Busscher	Kaninchen	per os	0,025 Acid. ars.	—
Brouardel	„	intravenös	0,007 „ „	—
„	„	subcutan	0,01 „ „	—
„	„	per os	0,02—0,03 „ „	—
Rouyer	„	—	0,003 „ „	—
Salkowski	„	—	—	0,01 Acid. arsenic.
Nencki u. Sieber	„	—	—	verträgt 0,01 Kal. ars.
Kochmann	„	intravenös	0,00456—0,0053 As in Form vom Kal. ars.	—
Brouardel	Meerschweinchen	subcutan	0,013 Acid. ars.	—
„	„	intraperitoneal	0,016 „ „	—
„	„	intrapleural	0,01 „ „	—
„	„	per os	0,02—0,03 „ „	—
Kunkel	Hund	intravenös	0,002—0,003 Kal. ars.	—
„	„	per os	0,03 „ „	—
Busscher	„	„ „	0,3—0,4 Acid. arsenic.	—
Doyen u. Morel	„	„ „	verträgt 1,0 Acid. ars.	—
Fröhner	„	„ „	—	0,1—0,2 Acid. ars.
„	Pferd u. kl. Wiederkäuer	„ „	—	10—15 „ „
„	Hornvieh	„ „	—	15—30 „ „
„	Schwein	„ „	—	0,5—1,0 „ „
„	Huhn	„ „	—	0,1—0,15 „ „
Hausmann	„	„ „	0,15 Kal. arsenic. (nicht sicher tödlich)	—
Willberg	Igel	subcutan	0,011—0,015 Kal. ars.	—

Vergleichen wir endlich unsere Resultate mit Literaturangaben (siehe Tabelle XI), so ersehen wir, daß das Kaninchen durch 0,016 g Acid. arsenic., per os eingeführt, eingeht (siehe Tabelle III). Nach Busscher hingegen beträgt die minimale tödliche Dosis des Kaninchens 0,025 g pro 1 kg, nach Brouardel 0,02 bis 0,03 g pro 1 kg; nach Nencki und Sieber töten 0,01 g Kal. arsenic. das Kaninchen.

Nach unseren Versuchen kann das russische Kaninchen subcutan bis 0,01 g pro 1 kg vertragen (Tabelle IV).

Diese Schwankungen in der Größe der letalen Arsendosen des Kaninchens bei verschiedenen Autoren hängen vielleicht von der Rasse und der Art der Ernährung der Kaninchen ab.

Bei Hunden haben verschiedene Autoren verschiedene minimale tödliche Dosen gefunden (siehe Tabelle XI).

Wir haben diese Daten an einer großen Anzahl (10) von Hunden kontrolliert und Resultate erzielt, die mit keinen Angaben der genannten Autoren übereinstimmen. (Vgl. Tabelle I und XI.)

So wundert es uns kaum, daß nach Doyen und Morell der Hund per os ohne tödlichen Ausgang 1 g arsenige Säure verträgt. Der Hund besitzt nämlich im Brechakt eine Schutzvorrichtung.

Nach Hausmann besitzen die Hühner eine große natürliche Resistenz dem Arsen gegenüber und gilt 0,15 g Acid. arsenic. pro 1 kg als nicht sicher tödlich. Nach unseren Versuchen (siehe Tabelle VI) töteten 0,066 bis 0,15 g pro 1 kg die Hühner in 12 bis 144 Stunden. Die Frage der natürlichen Resistenz der Hühner bleibt fürs erste noch unentschieden.

Anhang.

Mikroskopische Untersuchungen auf Fett hin wurden an den Organen von 5 Hunden (Nr. 1, 2, 7, 8, 10) vorgenommen, wobei zur Färbung Scharlach R. benutzt wurde. — In der Regel wurden folgende Organe untersucht: Herz, Leber, Niere, Pankreas; zuweilen aber auch Lunge, Milz, Blutgefäße usw. Von den chronisch vergifteten Hunden wurden beim Hunde Nr. 1 die am stärksten ausgeprägten Veränderungen gefunden: in der Leber Ansammlungen von lymphoidem Gewebe mit Fettdegeneration. Letztere konnte auch in den Leberzellen nachgewiesen werden. Die Fettdegeneration war in den Follikeln des Dünndarms besonders stark ausgeprägt. Bei fast gleichen Versuchsbedingungen, aber einer annähernd zweimal kürzeren Versuchsdauer wurden weniger stark ausgeprägte Veränderungen beim Kaninchen Nr. 18 gefunden. Möglicherweise hat die Versuchsdauer einen gewissen Einfluß auf die pathologischen Veränderungen in den Organen. Einmalige nicht tödliche Dosen von 0,005 bis 0,007 g pro 1 kg verursachten auch keinerlei Veränderungen. Interessant ist, daß in einem Fall (Versuch 10) nach einer Dosis von 0,008 g pro 1 kg, wo der Tod nach 9 Stunden eintrat, die Fettdegeneration in der Milz, Leber, Niere, besonders im Dünndarm stark ausgeprägt war. Unsere Versuche zeigen, daß bei Hunden bei Arsengaben per os, sub-

cutan und intravenös relativ unbedeutende pathologisch-anatomische Veränderungen vorgefunden werden. Letzteres steht in vollem Einklang mit früher bei Salvarsan gemachten Beobachtungen, wo bei Hunden therapeutische Dosen keine Veränderungen in den Organen hervorrufen (Arch. des sciences biolog. 17, 4).

Bei den Katzen wurden die Organe folgender Tiere (Nr. 11, 13, 14, 15) untersucht, wobei bei den Organen der Katze Nr. 13, die wiederholte Arseninjektionen erhielt (0,005 und 0,006 g pro 1 kg), eine sehr stark ausgeprägte Fettdegeneration des Herzens, der Leber, der Milz und des Dünndarms ermittelt wurde.

In den Organen der Katzen Nr. 14 und 15 fanden sich nur unbedeutende Fettdegenerationen in der Leber und den Nieren vor. Es ist anzunehmen, daß die starken Veränderungen in Versuch 13 von den wiederholten Arseninjektionen abhängen, wobei die erste Arsengabe relativ leicht vertragen wurde, bei der zweiten Gabe trat der Tod in ca. 2 Tagen ein.

Bei den Hunden haben wir schon gesehen, daß starke Veränderungen schon nach einigen Stunden nach erfolgter Injektion eintreten können.

In betreff der Kaninchen, die Arsen per os erhielten (Nr. 25, 29, 30 und 31) sind sehr starke Veränderungen in den Organen zu verzeichnen.

Alle von mir aus dieser Versuchsserie untersuchten Tiere, mit Ausnahme von Nr. 30, wiesen starke Fettdegenerationen des Herzens, der Leber, der Niere, des Dünndarms und der Milz auf. Das Nichtvorhandensein von Veränderungen bei Kaninchen Nr. 30 erklärt sich nur durch die Individualität dieses Tieres. Da das Tier genügend lange nach der Arsengabe lebte, hätten eventuelle Veränderungen eintreten können.

Da von mir eine Resistenz der Hunde dem Salvarsan gegenüber festgestellt ist, habe ich diese Versuche ausgeführt, um den Grund der Salvarsanresistenz der Hunde festzustellen. Bei meinen Salvarsanversuchen konnte ich feststellen, daß in den Organen der Hunde keine Fettdegeneration nachzuweisen war.

Bei den Kaninchen hingegen, die gleiche Salvarsandosen erhielten, fanden sich deutlich ausgeprägte Fettdegenerationen des Herzens, der Leber und der Niere. Vorliegende Versuche

liefern den Beweis, daß die Hunde im Vergleich zum Kaninchen eine bedeutende Arsenresistenz besitzen. Diesen Schluß hätte man a priori aus meinen Salvarsanversuchen ziehen können.

Bemerkenswert ist noch dieses Faktum, daß pathologisch-anatomische Veränderungen bei ein und derselben Tierart nicht immer der pharmakologischen Wirkung des Mittels, auch nicht der Dosis des Arsens, entsprechen. So wurde bei einem Kaninchen keine Fettdegeneration gefunden, während bei anderen Kaninchen bei gleichen Bedingungen die Fettdegeneration stark ausgeprägt war. Dieses wäre nur durch Individualität zu erklären.

Nachweis und Bestimmung der Ameisensäure.

Von

Heinrich Fincke (Köln).

(Eingegangen am 4. Mai 1913.)

Mit 2 Figuren im Text.

Die flüchtigen organischen Säuren setzen ihrer quantitativen Bestimmung keine Schwierigkeiten entgegen, wenn sie rein oder in Form reiner Salze vorliegen; ihre Bestimmung ist aber oft schwierig, wenn sie zu mehreren gleichzeitig und neben anderen organischen Stoffen vorhanden sind. In tierischen wie pflanzlichen Lebewesen, in deren Ausscheidungen und in den aus Organismen oder mit ihrer Hilfe gewonnenen Erzeugnissen finden sich aus einer Reihe homologer Säuren oft mehrere Glieder; besitzen diese eine nur wenig voneinander abweichende Kohlenstoffatomzahl (z. B. $C_3H_6O_2$ und $C_4H_8O_2$ oder $C_4H_6O_2$ und $C_5H_8O_2$), so sind sie auch in ihren Eigenschaften meist nur wenig voneinander verschieden. Bei der Bestimmung der flüchtigen Säuren müssen wir uns daher oft, wenn die Möglichkeit zu langwierigen Untersuchungen nicht gegeben ist, damit begnügen, die Gruppe der flüchtigen Säuren als Gesamtheit oder auch getrennt in die Untergruppen der wasserlöslichen und wasserunlöslichen flüchtigen Säuren ihren Mengen nach festzustellen. Doch sind auch diese Verfahren nicht stets genau und einwandfrei, da sowohl die Flüchtigkeit wie die Wasserlöslichkeit Eigenschaften sind, die mit steigendem Molekulargewicht der Säuren allmählich sich ändern, so daß gar keine scharfe Grenze zwischen flüchtigen und nichtflüchtigen oder zwischen löslichen und unlöslichen Säuren zu ziehen ist. Die üblichen Bestimmungsverfahren werden daher nach vereinbarten Vorschriften ausgeführt, so daß sie, wenn auch nicht absolut richtige, doch untereinander vergleichbare Ergebnisse liefern.

Von der Regel, daß die Eigenschaften der Säuren einer homologen Reihe sich stufenweise ändern, macht in der Essigsäurereihe die Ameisensäure ebenso eine Ausnahme, wie auch in einzelnen anderen Reihen die Anfangsglieder abweichen. Die Ameisensäure ist durch besondere Eigenschaften ausgezeichnet, die leicht erklärlich sind, da in ihrer Konstitutionsformel

$$HCOOH = H - \vdots\, C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown OH \end{matrix} = OH - \vdots\, C \begin{matrix} \diagup O \\ \diagdown H \end{matrix},$$

die sie entweder als die mit Wasserstoff verbundene Carboxylgruppe oder als die mit der Hydroxylgruppe verbundene Aldehydgruppe kennzeichnet, neben dem Säurecharakter Aldehydcharakter zum Ausdruck kommt. Im Gegensatz zu den übrigen Gliedern der gleichen Reihe ist sie daher gegen Oxydationsmittel wenig beständig und auch in anderen Richtungen reaktionsfähiger. Man spricht daher richtigerweise von der Essigsäurereihe und nicht von einer Ameisensäurereihe.

Die große Reaktionsfähigkeit ist einer der Gründe, weshalb die Ameisensäure diejenige Säure der Essigsäurereihe ist, deren Nachweis und quantitative Bestimmung am häufigsten untersucht worden sind. Da die abweichende Konstitution zugleich abweichendes physiologisches Verhalten vermuten läßt, lag auch hierin ein Reiz, Verfahren zu ihrer Bestimmung ausfindig zu machen.

Die Ameisensäure soll in zahlreichen Pflanzen und tierischen Organen vorkommen [1]), und sie entsteht bei vielen chemischen Vorgängen, vor allem bei Zersetzungen der Kohlenhydrate. In neuester Zeit ist das Interesse an guten Ameisensäurebestimmungsverfahren besonders stark geworden. Sie wird in immer stärkerem Maße als Konservierungsmittel benutzt, obgleich ihre Unschädlichkeit noch umstritten ist. Da die Eignung der Ameisensäure zum Konservieren vielfach mit dem angeblich reichlichen Vorkommen im Honig begründet wurde, befassen sich eine Reihe von Arbeiten mit der Ameisensäurebestimmung im Honig [2]). Auf den Ameisensäuregehalt gründet sich ein Verfahren zur Unterscheidung von Essenzessig (aus Holzessigsäure) und Gärungsessig [3]). Auch zur Entscheidung anderer nahrungsmittelchemischer Fragen, z. B. zur Unterscheidung von Rum und Kunst-

[1]) Literaturangaben über Vorkommen (wirkliches und angebliches) von Ameisensäure finden sich im Biochem. Handlexikon **1**, 912, Berlin 1911, und in Neuberg, Der Harn **1911**, S. 222 bis 230.

[2]) Fincke, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **23**, 255, 1912. — Daselbst weitere Literaturangaben.

[3]) Fincke, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **22**, 100, 1911.

rum[1]), wird die Ameisensäurebestimmung mit Erfolg herangezogen werden können. In den letzten Jahren ist die Rolle, die die Ameisensäure bei Gärungen einnimmt, untersucht worden. Sie tritt bei Fäulnisprozessen auf; besonders interessant ist es, daß sie bei der Vergärung von Zucker zu Alkohol und Kohlensäure Zwischenprodukt zu sein scheint; durch Hefen können sowohl beträchtliche Mengen Ameisensäure gebildet wie vergoren werden, Vorgänge, die offenbar enzymatischer Natur sind[2]). Auch bei der Zuckerspaltung im tierischen Organismus scheint Ameisensäure als Zwischenprodukt zu entstehen[3]). Einzelne Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung von Formaldehyd[4]) beruhen auf der Überführung in Ameisensäure. Neuerdings soll Ameisensäure in der Kohlenoxyd- und Bunsenflamme und infolgedessen auch in der Laboratoriumsluft nachgewiesen sein. Die Verbrennung von Kohlenoxyd zu Kohlendioxyd soll nämlich über die Zwischenphase der Ameisensäure führen[5]):

$$C:O \longrightarrow {}^{HO}_{H}\!>C:O \longrightarrow CO_2 + H_2,$$

$$H_2 + \frac{O_2}{2} \longrightarrow H_2O.$$

Sogar in der atmosphärischen Luft soll Ameisensäure vorhanden sein (?)[6]).

Endlich hat die Ameisensäurebestimmung auch für den Nachweis von Methylalkoholvergiftungen Wichtigkeit erlangt[7]).

Wenn im vorhergehenden die Ergebnisse bisheriger Ameisensäurenachweise und Bestimmungen nur kurz gestreift wurden, so darf doch nicht unausgesprochen bleiben, daß manche, besonders ältere Angaben über das Vorkommen von Ameisensäure einer Kritik nicht standhalten; einerseits wurden die Untersuchungsobjekte bei der Prüfung auf Ameisensäure oft Einwirkungen (z. B. von Alkalien oder Mineralsäuren) ausgesetzt, durch die Ameisensäure gebildet werden konnte,

---

[1]) Fincke, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **25**, 1913. Die Arbeit befindet sich im Druck.

[2]) Franzen und Steppuhn, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 129, 1912. Daselbst weitere Literaturangaben.

[3]) Steppuhn und Schellbach, Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 274, 1912.

[4]) Auerbach und Plüddemann, Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **30**, 195, 1909. — Curtius und Franzen, Sitzungsber. d. Heidelb. Akad. Math.-naturw. Klasse. **1912**, Abt. A 7, 19.

[5]) Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 680 u. 2613, 1912.

[6]) Henriet, Compt. rend. **136**, 1465, 1903.

[7]) Juckenack, Prause, Griebel, Jacobsen und v. Gaza, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **24**, 13, 1912.

andererseits wurden Nachweisverfahren angewandt, die nicht für Ameisensäure spezifisch sind.

Zunächst soll erörtert werden, welche Reaktionen der Ameisensäure sich zum Nachweise und zur quantitativen Bestimmung eignen.

Verbindungen der Ameisensäure, die sich durch Schwerlöslichkeit beträchtlich von denen der anderen flüchtigen Säuren unterscheiden, sind nicht bekannt. Wenn auch vielleicht in einem einzelnen Falle, z. B. bei der Analyse chemischer Reaktionsprodukte, die Schwerlöslichkeit einzelner ameisensaurer Salze ein Mittel zur Trennung abgeben kann, so kommen doch solche Verfahren im allgemeinen, vor allem bei der Untersuchung pflanzlicher und tierischer Objekte, nicht in Betracht.

Zur qualitativen wie quantitativen Feststellung der Ameisensäure ist von vielen Seiten die Reaktion empfohlen, die konzentrierte Schwefelsäure auf Ameisensäure und Formiate ausübt: Zerlegung in Wasser und Kohlenoxyd. Diese Reaktion ist zuerst von Wegner[1]) angegeben; sie wird von Kempf[2]), Merl[3]), Ost und Klein[4]), Röhrig[5]), Loock[6]) und anderen empfohlen. Man verfährt so, daß man das eingetrocknete Salzgemisch in einem kleinen Kölbchen unter Durchleiten von Kohlensäure durch Erwärmen mit konzentrierter Schwefelsäure zersetzt und das gebildete Kohlenoxyd über Natronlauge auffängt und gasvolumetrisch bestimmt. Dadurch, daß man das Gas durch ammoniakalische Kupferchlorürlösung absorbieren läßt, kann man leicht feststellen, daß es wirklich aus Kohlenoxyd bestand. In manchen Fällen, vor allem zur Kontrolle anderer Nachweisverfahren, mit Vorteil anwendbar, ist das Kohlenoxydverfahren doch nicht ohne Nachteile und ziemlich umständlich. Bei sehr geringen Ameisensäuremengen — 1 mg Ameisensäure gibt etwa 0,5 ccm Kohlenoxyd — wirkt die Schwierigkeit, einen völlig luftfreien Kohlensäurestrom zu erzeugen, ungünstig. Wie weit andere organische Säuren stören können — Milchsäure und Blausäure erzeugen unter gleichen Bedingungen ebenfalls Kohlenoxyd —, ist noch nicht genügend erforscht. Der Wert des Kohlenoxydverfahrens besteht darin, daß es auf einer völlig anderen Reaktion beruht, wie die übrigen quantitativen Bestimmungsmethoden, die sämtlich auf der leichten Oxydierbarkeit der Ameisensäure fußen, und daß es daher in zweifelhaften Fällen einen Befund sicher stellen kann.

Eine weitere Reaktion der Ameisensäure ist die Bildung von Aldehyden beim Erhitzen der Erdalkalisalze der Säuren der Essig-

---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. **42**, 427, 1903.
[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 3723, 1906.
[3]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **16**, 385, 1908.
[4]) Chem.-Zeitg. **3**, 815, 1908.
[5]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **19**, 1, 1910.
[6]) Zeitschr. f. öffentl. Chem. **16**, 350, 1910.

säurereihe mit entsprechendem Formiat. Woodmann und Burwell[1]) dampfen die mit Essigsäure und Kalkmilch versetzte Flüssigkeit ein, unterwerfen den Rückstand der trockenen Destillation und prüfen im Destillat mittels fuchsinschwefliger Säure auf Aldehyd. Da durch derartige energische Behandlung Aldehydbildung auch bei Ameisensäureabwesenheit nicht ausgeschlossen ist, da es ferner nicht einwandfrei ist, die Anwesenheit von Ameisensäure aus der Bildung eines nicht näher zu charakterisierenden Aldehyds, also nur aus dem Eintritt einer allgemeinen und dabei wenig zuverlässigen Aldehydreaktion zu folgern, muß dies Verfahren ausscheiden.

Eine in ihren Phasen lange bekannte Reaktion, die zum Nachweise von Ameisensäure bisher nicht herangezogen zu sein scheint, besteht in der Überführung in Cyanwasserstoff. Dieser ist selbst in den geringsten Mengen durch eindeutige Reaktionen nachzuweisen. Ameisensaures Ammoniak geht beim Erhitzen unter Wasserabspaltung in Formamid und dieses durch weitere Wasserabspaltung, die durch Phosphorpentoxyd bewirkt werden kann, in Blausäure über:

$$HCOO(NH_4) = HCO - NH_2 + H_2O,$$
$$HCO(NH_2) = HCN + H_2O.$$

Man verreibt einige Körnchen ameisensaures Salz mit wenig Ammoniumsulfat und Bariumcarbonat, gibt die Mischung nebst einer kleinen Messerspitze Phosphorpentoxyd in ein trockenes Reagensglas und mischt oberflächlich durch Schütteln. Das Reagensglas wird dann mit einem lose schließenden Kork, in den ein mit gelbem Schwefelammonium befeuchteter Filtrierpapierstreifen eingeklemmt ist, verschlossen und sofort mit dem unteren Teile, in dem sich das Pulver befindet, über einer kleinen Flamme erhitzt, bis aus dem Rohre Dämpfe zu entweichen beginnen. Man beläßt den Papierstreifen noch kurze Zeit im Rohre, trocknet ihn dann in einem Porzellanschälchen auf dem Wasserbade und befeuchtet ihn mit verdünnter angesäuerter Eisenchloridlösung. Rotfärbung — durch Bildung von Ferrirhodanat bewirkt — zeigt Ameisensäure an. Bei Gegenwart anderer organischer Stoffe dürfte das Verfahren in dieser Form nicht anwendbar sein, da manche organischen Stoffe bei trockener Destillation mit Ammonsalzen Blausäure liefern können. Vielleicht würde sich dieser Nachteil durch vorsichtigeres Erhitzen

---

[1]) Chem.-Zeitg. 32, 409, 1908.

als in der Flamme aufheben lassen, doch wurden weitere Versuche nicht angestellt, da inzwischen in der nachher behandelten Reaktion von Fenton und Sisson ein recht guter Ameisensäurenachweis bekannt geworden ist. Die Blausäurereaktion wurde dennoch erwähnt, weil sie die leichte Überführbarkeit der Ameisensäure in Blausäure, die in der umgekehrten, ebenfalls leicht eintretenden Reaktion ein Gegenstück besitzt, auf einfache Weise zeigt.

Die beste der Ameisensäurereaktionen ist diejenige von Fenton und Sisson[1]), die darin besteht, daß Ameisensäure in saurer Lösung durch Magnesium zu Formaldehyd reduziert wird. Das Verfahren setzt vorherige Abwesenheit oder Entfernung von Formaldehyd voraus. Gegen andere Reaktionsmittel ist Ameisensäure sehr beständig, so sehr, daß ich vorschlagen konnte, einzelne Fehlerquellen bei dem Quecksilberchloridverfahren, z. B. Glyoxylsäure, eine in unreifen Früchten vorkommende Aldehydsäure, durch Behandlung mit Zink in schwefelsaurer Lösung oder mit Natriumamalgam unschädlich zu machen[2]). Ameisensäure wird hierbei nicht merklich angegriffen. Es muß daher auffallend erscheinen, daß Magnesium stärker auf Ameisensäure einwirkt. Die Erklärung dürfte darin zu suchen sein, daß Magnesium selbst die Reaktion katalytisch beeinflußt, wie es auch in anderen Fällen Oxydations- und Reduktionsvorgänge erleichtert. Das Formaldehydverfahren wurde von Juckenack und seinen Mitarbeitern[3]) mit Erfolg angewandt und ist auch vom Kaiserlichen Gesundheitsamte[4]) als amtliches Verfahren vorgeschlagen. Das Gesundheitsamt läßt die Flüssigkeit, in der Ameisensäure nachgewiesen werden soll, zunächst auf Formaldehyd prüfen und z. B. bei Essig in folgender Weise verfahren:

Von 100 ccm Essig bzw. 10 fach verdünnter Essigessenz werden nach Zusatz von 10 g Kochsalz und 0,5 g Weinsäure etwa 75 ccm abdestilliert. 5 ccm des durch Umschütteln gemischten Destillats werden sodann mit 2 ccm frischer Milch und 7 ccm Salzsäure vom spezifischen

[1]) Proc. Cambridge Phys. Soc. 14, 385, 1908. Ref. Chem. Centralbl. 79, I, 1379, 1908.

[2]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 22, 93, 1911.

[3]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 24, 13, 1912.

[4]) Entwürfe zu Festsetzungen über Lebensmittel. „Essig und Essigessenz“, Heft 3, S. 16. Berlin 1912.

Gewicht 1,124, die auf 100 ccm 0,2 ccm einer 10%igen Eisenchloridlösung enthält, in einem geräumigen Probierglase erhitzt und 1 Minute lang in lebhaftem Sieden erhalten. Die Gegenwart von Formaldehyd bewirkt Violettfärbung.

Der Rest des für die Prüfung auf Formaldehyd benutzten Destillats (etwa 70 ccm) wird mit 10 ccm Normal-Alkalilauge auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird, wenn die Prüfung auf Formaldehyd positiv ausgefallen war, nach einstündigem Erhitzen auf 130°, im anderen Falle ohne weiteres mit 10 ccm Wasser und 5 ccm Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,124 aufgenommen und die Lösung in einem kleinen, mit einem Uhrglase zu bedeckenden Kölbchen nach und nach mit 0,5 g Magnesiumspänen versetzt. Nach zweistündiger Einwirkung des Magnesiums werden 5 ccm der Lösung in ein geräumiges Probierglas abgegossen und in der angegebenen Weise mit Milch und eisenhaltiger Salzsäure auf Formaldehyd geprüft. Färbt sich hierbei die Flüssigkeit oder wenigstens das unmittelbar nach Beendigung des Kochens sich abscheidende Eiweiß deutlich violett, so ist der Nachweis von Ameisensäure erbracht.

Wie ich vor kurzem[1]) zeigte, läßt sich die Dauer der Einwirkung des Magnesiums auf die ameisensäurehaltige Flüssigkeit erheblich abkürzen, wenn man nicht die Säuremenge auf einmal und das Magnesium allmählich zugibt, sondern umgekehrt verfährt. Im ersten Falle schwimmen die Magnesiumspäne auf der Flüssigkeit, und Metall wie Wasserstoff kommen nur mit wenig Flüssigkeit in Berührung. Befindet sich dagegen das gesamte Magnesium in der Flüssigkeit, so ist die zu gleicher Zeit wirksame Metallfläche viel größer und die Reduktion verläuft in kürzerer Zeit. Man verfährt zweckmäßig in folgender Weise: 10 ccm der zu prüfenden neutralen oder schwachsauren Lösung werden in ein Reagensglas gegeben und mittels Glasstab 0,5 g Magnesiumband in Form einer Spirale oder eines zusammengewickelten Knäuels, das sich federnd im Reagensglase anklemmt, in die Flüssigkeit hineingedrückt. Unter guter Kühlung (durch Einstellen in ein größeres Gefäß mit kaltem Wasser) fügt man etwa 6 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124) tropfenweise innerhalb etwa 15 Minuten hinzu, läßt noch einige Minuten stehen und prüft dann 5 ccm der abgegossenen Flüssigkeit auf Formaldehyd. Die Reaktion tritt so mit noch geringeren Mengen Ameisensäure ein als nach der Vorschrift des Kaiserlichen Gesundheitsamtes. 0,5 mg Ameisensäure in 10 ccm

---

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **25**, 389, 1913.

Flüssigkeit geben noch eine Reaktion, wenn man zum Formaldehydnachweis Milch und Eisenchloridsalzsäure benutzt. Ob und wie weit die auf Ameisensäure zu prüfende Flüssigkeit vorher konzentriert werden muß, ist in jedem Falle auf Grund der angegebenen Empfindlichkeit zu entscheiden.

Der vom Kaiserlichen Gesundheitsamte vorgeschlagene Nachweis des bei der Reduktion entstandenen Formaldehyds ist ein altes erprobtes und sehr empfindliches Verfahren.

Wenn gleich an Reaktionen auf Formaldehyd kein Mangel herrscht, sei hier doch die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure kurz besprochen, da auch sie sich im vorliegenden Falle eignet, und da über die verschiedene Anwendung der fuchsinschwefligen Säure einerseits zur Prüfung auf Formaldehyd, andererseits auf Aldehyde im allgemeinen Klarheit vielfach nicht zu herrschen scheint. Daß mit schwefliger Säure eben entfärbte Fuchsinlösung durch Aldehyde gerötet wird, ist bekannt. Die Reaktion ist aber wenig zuverlässig, denn z. B. auch das Filtrat einer Aufschwemmung von kohlensaurem Kalk, selbst Leitungswasser — nicht destilliertes — zeigen diese Reaktion. Bei Gegenwart einer nicht zu geringen Menge freier Säure ist die fuchsinschweflige Säure aber ein gutes Reagens auf Formaldehyd[1]). Andere Aldehyde stören nicht. Nach dem Vorschlage von Große-Bohle versetzt man 10 ccm der zu prüfenden Flüssigkeit zunächst mit 1 bis 2 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,124) und dann mit 1 ccm fuchsinschwefliger Säure (0,1 $^0/_0$ Rosanilinhydrochlorid enthaltend). Bei Anwesenheit von Formaldehyd tritt je nach dessen Menge in einigen Minuten bis einigen Stunden eine blau- bis rotviolette Färbung auf. Während die übliche Reaktion auf Aldehyde mit fuchsinschwefliger Säure außer durch Salzsäure auch durch großen Überschuß an schwefliger Säure verhindert wird, ist dieser hier ohne Einfluß. Die Färbung beruht auf der Entstehung eines Farbstoffes aus Fuchsin, Formaldehyd und schwefliger Säure; die Herstellung dieses Farbstoffs ist Gegenstand des D. R. P. 105 862[2]). Gegenüber der Reaktion mit Milch und Eisenchloridsalzsäure hat diese Reaktion den Nachteil, daß sie um ein Geringes weniger empfindlich ist, und daß bei sehr kleinen Mengen die Reaktion erst in einigen Stunden deutlich sichtbar wird. Zur Kontrolle, oder wenn brauchbare Milch[3]) nicht zur Verfügung steht, leistet die Reaktion auf Formaldehyd mit fuchsinschwefliger Säure und Salzsäuren im vorliegenden Falle wie

---

[1]) Große-Bohle, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **14**, 89, 1907. — Denigès, Compt. rend. **150**, 529, 832, 1910. Ref. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **23**, 229, 1912.

[2]) Beilstein, Ergänzungsband **2**, 668, 1903.

[3]) Für die Reaktion auf Formaldehyd ist frische Milch anzuwenden, von der festgestellt ist, daß sie frei von Formaldehyd ist, und daß sie geringe Formaldehydmengen erkennen läßt.

in vielen anderen Fällen gute Dienste. Die Grenze des Eintrittes der Reaktion liegt bei einer Formaldehydkonzentration 1 : 500 000. Bei ihrer Anwendung und Vornahme der Reduktion in der oben angegebenen Weise ist 1 mg Ameisensäure in 10 ccm Flüssigkeit nachweisbar.

Die übrigen zum Nachweise von Ameisensäure angewandten Reaktionen (Reduktion von Silbernitrat zu metallischem Silber, Ausscheidung von Kalomel beim Erhitzen mit Quecksilberchlorid, Bildung von Kohlensäure und Abscheidung von metallischem Quecksilber beim Erhitzen mit Quecksilberoxyd, Entfärbung von Kaliumpermanganat usw.) beruhen alle auf der reduzierenden Wirkung der Ameisensäure, ihrer leichten Oxydierbarkeit zu Kohlensäure. Bei Gegenwart anderer reduzierender Stoffe können sie leicht zu Täuschungen führen. Da jedoch die Reaktion von Fenton und Sisson ziemlich umständlich ist, wird man vielfach von der Reaktion mit Quecksilberchlorid als Vorprüfung Gebrauch machen. Tritt bei 1 bis 2stündigem Erhitzen eines schwach sauren, formaldehydfreien Destillates mit Quecksilberchlorid und Natriumacetat im Wasserbade keine Ausscheidung ein, die sich mit Ammoniak schwärzt, so erübrigt sich eine weitere Prüfung; erfolgt aber eine derartige Ausscheidung, so ist noch die Reaktion mittels Magnesium auszuführen.

Von den

quantitativen Bestimmungsverfahren

ist das Kohlenoxydverfahren von Wegner bereits erwähnt, die übrigen benutzen Oxydationsreaktionen. Liegen reine Ameisensäure oder reine Salze derselben vor, so lassen sich die verschiedensten Oxydationsmittel anwenden. In fast allen Fällen handelt es sich aber um die Bestimmung der Ameisensäure neben anderen organischen Stoffen; die Mehrzahl der Oxydationsverfahren kommt hierfür nicht in Betracht. Als Oxydationsmittel sind vorgeschlagen worden: Kaliumpermanganat, Kaliumdichromat, Chromsäure, Brom, Bromlauge, Jodsäure, Bromsäure und verschiedene Quecksilberoxydverbindungen.

Mit der Verwendung von Kaliumpermanganat teils in saurer, teils in alkalischer Lösung beschäftigen sich Arbeiten von Lieben[1]), Jones[2]), Klein[3]), Großmann und Aufrecht[4]) und Fouchet[5]). Die Bestimmung erfolgt entweder durch direkte Titration, bei der allerdings der Endpunkt oft schlecht zu erkennen ist, oder durch Zusatz eines Überschusses von Permanganat und Zurücktitration. Nicloux[6]) bestimmt kleine Ameisensäuremengen colorimetrisch mit Kaliumdichromat, Freyer[7]) oxydiert mit Chromsäure (bzw. mit Dichromat und

---

1) Monatsh. f. Chem. **14**, 746, 1893; **16**, 219, 1895.
2) Amer. chem. Journ. **17**, 540, 1895.
3) Arch. d. Pharmaz. **225**, 522, 1887.
4) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2455, 1906.
5) Apoth.-Zeitg. **27**, 362, 1912.
6) Chem. Centralbl. **2**, 916, 1897.
7) Chem.-Zeitg. **19**, 1184, 1895.

Schwefelsäure) und titriert den Überschuß jodometrisch. Macnair[1]) verwendet Chromsäure in der Weise, daß er zunächst die Gesamtmenge der flüchtigen Säure bestimmt, dann die Ameisensäure mit Chromsäure zerstört und die übriggebliebene Menge der flüchtigen Säure wieder ermittelt; die Differenz wird dann als Ameisensäure berechnet. Auch Schwarz und Weber[2]) haben dies Verfahren angewandt. Rupp[3]) oxydiert mit bekannten Mengen von Bromlauge, Jodsäure oder Bromsäure, Mäder[4]) oxydiert mit Brom; beide titrieren den Überschuß jodometrisch zurück. Joseph[5]) behandelt mit Brom und bestimmt die Ameisensäure aus dem gebildeten Bromwasserstoff, der als Bromsilber zur Wägung gebracht wird.

Eine besonders große Zahl von Bearbeitungen hat die Anwendung von Quecksilberoxydverbindungen gefunden, von denen das Oxyd selbst, das Chlorid, Acetat und Sulfat vorgeschlagen sind.

Die älteste Anwendungsform des Quecksilbers ist diejenige des Quecksilberoxyds von Göbel[6]), der das Kohlensäurevolumen mißt, das beim Erhitzen der ameisensäurehaltigen Flüssigkeit mit rotem Quecksilberoxyd entsteht. Da bei diesem Verfahren die Neigung des Quecksilbers, unlösliche Verbindungen einzugehen, keine Störung hervorrufen kann, da ferner nur solche oxydierbaren Stoffe Fehler bedingen können, die durch Quecksilberoxyd zu Kohlensäure oxydiert werden, so wäre das Verfahren immerhin einer Nachprüfung wert, bei der das Quecksilberoxyd auch durch Quecksilberchlorid und das Messen der Kohlensäure durch eine andere Bestimmungsart ersetzt werden könnten. Die Bestimmung als Kohlensäure ist für die Ameisensäure selbst sonst bisher nicht versucht worden. Die Bestimmung des Methylalkohols nach Thorpe und Holmes[7]) und nach W. König[8]) mittels Chromsäure beruht aber darauf, daß der Methylalkohol zunächst zu Formaldehyd, dann zu Ameisensäure oxydiert wird, aus der durch weitere Einwirkung der Chromsäure Kohlensäure entsteht, deren Menge gewichts- oder maßanalytisch ermittelt wird.

Portes und Ruyssen[9]) wandten zuerst Quecksilberchlorid an; sie erhitzen die ameisensäurehaltige Flüssigkeit mit einer abgemessenen

---

[1]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 27, 398, 1888.

[2]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 17, 195, 1909.

[3]) Arch. d. Pharmaz. 243, 69, 1905.

[4]) Apoth.-Zeitg. 27, 746, 1912.

[5]) Journ. Soc. Chem. Ind. 29, 1189, 1910. Ref. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 23, 226, 1912.

[6]) Pharm. Centralbl. 4, 224, 1833.

[7]) Journ. Chem. Soc. 85, 1, 1904.

[8]) Chem.-Zeitg. 36, 1025, 1912.

[9]) Compt. rend. 82, 1504, 1876; Zeitschr. f. anal. Chem. 16, 250, 1878.

Menge Quecksilberchloridlösung bei Gegenwart von Natriumacetat (auf 50 g $HgCl_2$ 27,5 g Natriumacetat) und titrieren den Quecksilberüberschuß mit Jodkalium zurück. In der von den Verfassern angegebenen Form ist das Verfahren nicht brauchbar. Scala[1]) ermittelte als Erster die Ameisensäuremenge aus dem Gewichte des Quecksilberchlorürniederschlages. Bei geringen Ameisensäuremengen erhielt er gute Werte; er fand auch, daß Essigsäure und Buttersäure nicht störend wirken. Lieben[2]) änderte das Verfahren ab, indem er die Dauer des Erhitzens (auf 6 bis 8 Stunden) und den Quecksilberchloridüberschuß (auf das 50 bis 60fache der angewendeten Ameisensäuremenge) erhöhte. Leys[3]) läßt dagegen die Oxydation mit Mercuriacetat vornehmen, das abfiltrierte, gewaschene und getrocknete Mercuroacetat in Salzsäure lösen und mittels Natriumchlorid in Mercurchlorid überführen, das dann zur Wägung gebracht wird. Sparre[4]) fand das Verfahren von Leys zu umständlich und empfahl dasjenige von Portes und Ruyssen, das auch Smith[5]) anwandte. Coutelle[6]) fand bei dem Verfahren von Leys Werte, die um 4 bis 8% zu niedrig waren. Dagegen erhielt er unter bestimmten Bedingungen mit der von Lieben ausgearbeiteten Scalaschen Methode richtige Ergebnisse. Coutelle erhitzte die Lösung des Bariumformiates — freie Ameisensäure sättigte er mit Bariumcarbonat ab — 12 Stunden lang im Wasserbade mit vierfachem Quecksilberchloridüberschuß. „Am günstigsten liegen die Verhältnisse bei einer Konzentration des Quecksilberchlorids von 4,8% und der Ameisensäure von 0,1%. Bei Einhaltung dieser Bedingungen ist die Bestimmungsweise hinsichtlich ihrer Genauigkeit den schärfsten anorganisch-analytischen Arbeitsmethoden ebenbürtig."

Buchner, Meisenheimer und Schade[7]) bestimmten die Ameisensäure ebenfalls durch Wägen des Quecksilberchlorürs; die bei der Reduktion von Quecksilberchlorid frei werdende Salzsäure machten sie durch Natriumnitrit unschädlich. Franzen und Greve[8]) bearbeiteten das Quecksilberchloridverfahren weiterhin eingehend. Da sie vor dem Eindampfen ihrer ameisensäurehaltigen, 1300 bis 1500 ccm betragenden Wasserdampfdestillate des Zeitverlustes wegen zurückschreckten, kam das Verfahren von Coutelle für sie nicht in Betracht, da es zu große Quecksilberchloridmengen erfordert hätte. Beim Arbeiten nach der Vorschrift Liebens erhielten sie zu niedrige Werte. Sie erkannten die Fehlerquelle richtig in der bei der Reduktion des Quecksilberchlorids frei werdenden Salzsäure und suchten sie durch mehrmalige Neutralisation der Zersetzungsflüssigkeit auszuschalten; hierbei ausfallendes Queck-

[1]) Gazz. chem. ital. 20, 293, 1890.
[2]) Monatsh. f. Chem. 14, 746, 1893.
[3]) Chem. Centralbl. 69, II, 388, 1898.
[4]) Zeitschr. f. anal. Chem. 39, 105, 1900.
[5]) Journ. Amer. Chem. Soc. 29, 1236, 1907.
[6]) Journ. f. prakt. Chem. 73, 69, 1906.
[7]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 4217, 1906.
[8]) Journ. f. prakt. Chemie 80, 368, 1909.

silberoxyd wurde durch späteren Zusatz von Salzsäure wieder in Lösung gebracht. Franzen und Greve verfahren in folgender Weise:

Die etwa 1 l betragende ameisensäurehaltige Lösung wird mit 100 bis 200 ccm Wasser, das das 15fache der angewandten Ameisensäure an Sublimat enthält, $^1/_2$ Stunde im siedenden Wasserbade erhitzt. Hierauf fügt man Natronlauge hinzu, bis der entstehende braungelbe Niederschlag beim Umrühren nicht mehr verschwindet, erhitzt wieder $^1/_2$ Stunde und wiederholt das Neutralisieren und Erhitzen nochmals. Dann fügt man 20 ccm Salzsäure hinzu, erhitzt wieder 1 Stunde, saugt den Niederschlag ab, trocknet ihn 6 bis 8 Stunden im Dampftrockenschrank und 12 Stunden im Vakuumexsiccator.

Dieses Verfahren ist somit ziemlich umständlich. Etwa zu gleicher Zeit untersuchten Auerbach und Plüddemann[1]) die Bestimmung der Ameisensäure mittels Quecksilberchlorid. Das gewichtsanalytische Verfahren zogen sie allerdings nicht in Betracht, sondern sie arbeiteten das alte maßanalytische Verfahren von Portes und Ruyssen zu einem brauchbaren Verfahren aus. Dieses zerfällt in zwei Teile, in die Reduktion des Quecksilberchlorids zu Kalomel und in die Titration des Quecksilberchloridüberschusses mit Jodkalium. Auerbach und Plüddemann fanden, daß die erstere Reaktion glatt beim Erhitzen im (nicht auf dem) Wasserbade innerhalb 2 Stunden verläuft, wenn durch Zusatz einer reichlichen Menge Acetats die Acidität auf einen kleinem Wert gehalten wird. Die zur Bindung der frei werdenden Salzsäure theoretisch erforderliche Acetatmenge ist ungenügend, weil schon die Acidität der freien Essigsäure stört; drängt man diese durch großen Acetatüberschuß zurück, so verläuft die Reaktion quantitativ. Es stellte sich ferner heraus, daß die Titration von Quecksilberchlorid in Jodkalium, bei der zuerst das lösliche Doppelsalz $HgJ_2 . 2\,KJ$ entsteht und erst wenn kein Kaliumjodid zur Bildung dieses Salzes zur Verfügung steht, eine bleibende Fällung von rotem Quecksilberjodid eintritt, nicht ganz theoretisch verläuft, sondern einen Korrektionsfaktor erfordert. Das Verfahren von Auerbach und Plüddemann ist zu empfehlen, wenn eine große Zahl von Bestimmungen gleichzeitig auszuführen sind und die zu bestimmenden Ameisensäuremengen nicht unter 5 mg betragen. Es sei daher hier ausführlich wiedergegeben.

Man bedarf folgender Lösungen:

1. Quecksilberchloridlösung von genau bekanntem Gehalte. Zweckmäßig löst man 59,01 g[2]) $HgCl_2$ mit Natriumchlorid zu 1000 ccm. 1 ccm entspricht dann 5,0 mg Ameisensäure.

2. Kaliumjodidlösung 20,7 g zu 100 ccm. Es ist reinstes Kaliumjodid anzuwenden, dessen Reinheit von Bromid und Chlorid durch Titration in einer gewogenen Menge mit Silberlösung festzustellen ist. Zum Abmessen der Jodkaliumlösung, von der für jede Analyse 2 ccm gebraucht werden, be-

[1]) Arb. a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **30**, 178, 1909.

[2]) Es sind 58,87 g vorgeschrieben; die Menge erhöht sich nach dem neueren Atomgewicht für Hg auf 59,01 g.

nutzt man stets dieselbe 2-ccm-Pipette. Durch Auswägen derselben mit Wasser oder durch Titration von 2 ccm (oder einem Mehrfachen) Jodkaliumlösung, die mit dieser Pipette abgemessen sind, mittels $^n/_{10}$-Silbernitratlösung stellt man das Ameisensäureäquivalent derselben fest. Sind für 2 ccm Jodkaliumlösung n ccm $^n/_{10}$-Silberlösung verbraucht, so ist das in Milligramm ausgedrückte Äquivalent gleich $\frac{n \cdot 0{,}1 \cdot 46{,}016}{8}$.

Die Ausführung der Analyse geschieht in folgender Weise:

„Die zu untersuchende Lösung wird, falls sie sauer oder alkalisch reagiert, neutralisiert und erforderlichenfalls in diesem Zustande auf ein kleines Volumen eingedampft. Dann bringt man sie unter Zusatz von mindestens 3 g Natriumacetat in ein langhalsiges 100-ccm-Kölbchen und fügt eine genau abgemessene Menge der Quecksilberchloridlösung hinzu, und zwar soviel, als dem vermuteten Ameisensäuregehalt, zuzüglich 20 bis 70 mg (möglichst 30 bis 50 mg) Ameisensäure, entspricht. Das Kölbchen, das nicht ganz gefüllt sein darf, wird bis an den Hals in ein siedendes Wasserbad gestellt, 2 Stunden darin belassen, dann abgekühlt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Nach gutem Durchmischen des Kolbeninhalts filtriert man durch ein trockenes Faltenfilterchen in ein trockenes Kölbchen, wobei die ersten Anteile des Filtrates wegen etwaiger Konzentrationsänderungen durch Adsorption am Filtrierpapier verworfen werden. Das Filtrat füllt man in eine Bürette und titriert damit 2 ccm der 1,25-normalen Kaliumjodidlösung — unter Vermeidung einer Verdünnung durch Spülwasser — bis zum ersten Auftreten einer rötlichen Trübung.

Sind v ccm des Filtrates zur Titration verbraucht worden, so liest man aus der Korrektionstabelle den zugehörigen Korrektionsfaktor f ab; dann sind $f \cdot v$ ccm des Filtrates dem angewendeten Kaliumjodid äquivalent. Bedeutet j das in Milligramm HCOOH ausgedrückte Ameisensäureäquivalent der 2 ccm Kaliumjodidlösung, so entspricht der Quecksilberüberschuß in den gesamten 100 ccm $\frac{j \cdot 100}{f \cdot v}$ mg Ameisensäure. Ist h das in Milligramm HCOOH ausgedrückte Ameisensäureäquivalent der angewandten Kubikzentimeterzahl der Quecksilberchloridlösung, so enthält die untersuchte Probe $\left(h - \frac{j \cdot 100}{f \cdot v}\right)$ mg HCOOH oder eine äquivalente Menge Formiat."

Korrektionstabelle.

v = ccm $HgCl_2$-Lösung, die bis zur beginnenden Rötung verbraucht sind.

f = Faktor, mit dem v zu multiplizieren ist, um die dem angewendeten Jodkalium äquivalente Menge $HgCl_2$-Lösung zu finden.

v	f	v	f	v	f	v	f
20	1,036	35	1,052	50	1,069	65	1,084
25	1,042	40	1,058	55	1,074	70	1,090
30	1,047	45	1,063	60	1,079	75	1,095

Auch Denigès[1]) bestimmt Ameisensäure maßanalytisch, indem er ihre Lösung mit einem abgemessenen Volumen einer $^{n}/_{10}$-Quecksilberchloridlösung bei Gegenwart von Natriumacetat $^{1}/_{4}$ Stunde im kochenden Wasserbade erhitzt und im Filtrat das überschüssige Quecksilberchlorid durch Titration mit Silber- und Rhodanlösung bestimmt. Brasch und Neuberg[2]) benutzten Mercurisulfat, um Ameisensäure bei gleichzeitiger Anwesenheit von Buttersäure zu zerstören und so eine Bestimmung beider Säuren zu ermöglichen. Delehaye[3]) oxydiert Ameisensäure mit Mercurisulfat und wägt das Mercurosulfat. Aus seinen eigenen Angaben geht hervor, daß das Verfahren ungenau ist.

Der Umstand, daß das an sich sehr gute maßanalytische Verfahren von Auerbach und Plüddemann unpraktisch ist, wenn es sich um die Ausführung weniger Bestimmungen handelt, und daß es peinliches Arbeiten und genau eingestellte Lösungen erfordert, veranlaßten mich, die entsprechende gewichtsanalytische Bestimmung einer Durcharbeitung zu unterwerfen[4]). Diese schien geboten, da sich die bisherigen Angaben vielfach widersprachen, und da ein Erfolg wahrscheinlich war, nachdem Auerbach und Plüddemann festgestellt, unter welchen Bedingungen die Reaktion zwischen Ameisensäure und Quecksilberchlorid quantitativ verläuft. Die Ergebnisse waren tatsächlich befriedigende. Ursprünglich hatte ich folgende Arbeitsweise vorgeschlagen[5]):

„Die neutrale oder schwach saure Lösung der Ameisensäure, deren Volumen bei geringen Mengen (höchstens bis 100 mg) 50 bis 100 ccm, bei größeren Mengen (etwa über 50 mg) 100 bis 300 ccm betragen soll, wird mit 3 bis 5 g Natriumacetat und einem mindestens das 15 fache der Ameisensäuremenge betragenden Gewichte Quecksilberchlorids versetzt und in einem Erlenmeyer-Kolben, auf den mittels Gummistopfen ein etwa 30 bis 40 cm langes Glasrohr als Rückflußkühler aufgesetzt ist, 2 Stunden im siedenden Wasser- oder im Dampfbade erhitzt, derart, daß der Kolben wenigstens soweit, als er Flüssigkeit enthält, vom Dampf umspült wird.

Das Volumen der Flüssigkeit kann — ohne daß die Genauigkeit Schaden leidet — in ziemlich weiten Grenzen schwanken; bei ganz geringen Ameisensäuremengen wählt man es natürlich möglichst klein. Das Quecksilberchlorid ist nicht in fester Form, sondern in Lösung zuzusetzen, die man zweckmäßig durch Lösen von 100 g Quecksilberchlorid und 30 g Natriumchlorid zu 1 l herstellt. Das Natriumacetat, dessen Menge bei sehr geringen Ameisensäuremengen erniedrigt werden kann und nur dann über 3 g erhöht werden muß, wenn mehr als 125 mg Ameisensäure vorhanden sind, kann dagegen in fester Form zugegeben werden. Das Erhitzen des Erlenmeyer-Kolbens erfolgt am besten derart,

---

[1]) Zeitschr. f. anal. Chem. **49**, 123, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. **13**, 302, 1908.

[3]) Chem. Zentralbl. 2, 1564, 1910.

[4]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **21**, 1, 1911.

[5]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **21**, 5, 1911.

daß man einen oder zwei engere Ringe des Wasserbades über ihn streift und ihn dann mittels Stativ und Klammer so in das Bad einhängt, daß die übergestreiften Ringe mit den übrigen Ringen des Bades eine schließende Fläche bilden; es befindet sich dann wohl der untere, nicht aber der obere Teil des Kolbens im Dampf. Das ausgeschiedene Quecksilberchlorür — ein Erkalten des Reaktionsgemisches braucht nicht abgewartet zu werden — wird in einem mit Asbestfüllung versehenen Gooch-Tiegel abgesaugt und mit warmem Wasser und zuletzt mit Alkohol und Äther gut ausgewaschen. Man trocknet den Niederschlag darauf $^{3}/_{4}$ bis 1 Stunde im Wasserbadtrockenschrank (95 bis 100°) und wägt nach dem Erkalten. Durch Multiplikation mit 0,0977 ergibt sich die Ameisensäuremenge."

Später[1]) zeigte ich, daß das Verfahren auch zur Bestimmung ganz kleiner Ameisensäuremengen geeignet sei. Inzwischen nahmen Franzen und Egger[2]) den Natriumacetatzusatz auf und überzeugten sich, daß derselbe den Zweck, den die mehrfache Neutralisation bei dem Verfahren von Franzen und Greve gehabt hatte, auf einfachere Weise erfüllt. Sie lassen für je 0,5 g Ameisensäure 50 ccm einer Lösung von 200 g Sublimat, 300 g Natriumacetat und 80 g Kochsalz in 1 l Wasser zusetzen und die 1 bis $1^{1}/_{2}$ l betragende Flüssigkeit 3 bis $3^{1}/_{2}$ Stunden im kochenden Wasserbade erhitzen. Das Kaiserliche Gesundheitsamt[3]) folgte bei der Ameisensäurebestimmung im wesentlichen meinen Vorschlägen. Erfahrungen bei der Ausführung von Ameisensäurebestimmungen in einer Reihe verschiedener Objekte veranlaßten mich, einen Zusatz von Natriumchlorid zu der Zersetzungsflüssigkeit in Vorschlag zu bringen[4]), da auf diese Weise gewisse Verunreinigungen des Quecksilberchlorürniederschlages vermieden werden.

Auf Grund der Ergebnisse früherer Bearbeiter des Quecksilberchloridverfahrens, die mir allerdings zum Teil, wie z. B. die Angaben von Buchner, Meisenheimer und Schade und diejenigen von Franzen und seinen Mitarbeitern, erst nachträglich bekannt geworden sind[5]), war es nicht schwer, ein einfaches und genügend genaues Verfahren zu finden, um reine Ameisensäure mittels Quecksilberchlorid gewichtsana-

[1]) Zeitschr. f Nahrungs- u. Genußmittel 22, 88, 1911.

[2]) Journ. f. prakt. Chem. 83, 323, 1911.

[3]) Entwürfe zu Festsetzungen über Lebensmittel. Heft 3. Berlin 1912.

[4]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 25, 386, 1913.

[5]) Zu einer Änderung meines Verfahrens bin ich durch diese Arbeiten nicht geführt worden.

lytisch zu bestimmen. Mannigfache Schwierigkeiten bereiteten dagegen Entfernung und Unschädlichmachung anderer organischer Stoffe. Denn so zahlreich die Verfahren sind, die sich mit der Bestimmung reiner Ameisensäure befassen, bzw. nur zu diesem Zwecke sich eignen, so spärlich, lückenhaft und vielfach unrichtig waren die Angaben, wie man bei Gegenwart anderer Stoffe, besonders solcher aus dem Tier- und Pflanzenreich, zu einwandfreien Ergebnissen kommt. Das Hauptaugenmerk richtete ich daher, abgesehen von der Verwendung der Ameisensäurebestimmung zur Lösung bestimmter nahrungsmittelchemischer Fragen, auf die Ausschaltung der Fehlerquellen, die ihren Grund haben in der geringen Flüchtigkeit der Ameisensäure mit Wasserdämpfen, in der leichten Bildung von Ameisensäure durch Zersetzung von Zucker und in der Gegenwart von Stoffen, die störende Reaktionen mit Quecksilberchlorid bedingen. Im folgenden soll die praktische Ausführung von Ameisensäurebestimmungen unter verschiedenen Verhältnissen eingehend behandelt werden.

Dieser Arbeit liegt das Quecksilberchloridverfahren zugrunde. Für seine Wahl waren verschiedene Gründe maßgebend. Von den Oxydationsmethoden ist es deshalb das beste, weil die Tendenz des Quecksilberchlorids, andere Stoffe außer Ameisensäure zu oxydieren, ziemlich gering und weil beim Quecksilberchlorid die Reaktion leicht zu verfolgen ist. Ferner ist der Umstand günstig, daß die Menge des Reaktionsproduktes, das zur Wägung gelangt, des Quecksilberchlorürs, die Menge der durch dasselbe angezeigten Ameisensäure um das 10fache übertrifft, so daß Wägefehler keine Rolle spielen. Gegenüber dem Kohlenoxydverfahren hat das Quecksilberchloridverfahren den Vorzug größerer Einfachheit, der Möglichkeit, mehrere Bestimmungen zu gleicher Zeit zu machen, sowie der größeren Genauigkeit, vor allem bei kleinen Ameisensäuremengen. Bei dem Kohlenoxydverfahren fehlt ferner noch eine eingehende Untersuchung über störende Stoffe. Bekannt ist, daß Milchsäure dabei ebenfalls Kohlenoxyd entwickelt. Milchsäure kommt in vielen pflanzlichen und tierischen Untersuchungsobjekten vor und ist durch Wasserdampfdestillation

nur unzulänglich von Ameisensäure zu trennen, da sie — wenn auch in geringerem Grade — mit Wasserdampf flüchtig ist. In diesen Fällen ist das Kohlenoxydverfahren somit nicht brauchbar. Aber auch da, wo es angewandt werden soll, wird manches aus den nachfolgenden Mitteilungen mit Vorteil verwertet werden können; vor allem ist die Trennung der Ameisensäure von nichtflüchtigen Stoffen bei jedem Bestimmungsverfahren erforderlich.

Die Wasserdampfdestillation ist das hierzu fast allein in Betracht kommende Mittel. Nur in wenigen Fällen ist sie entbehrlich, z. B. dann, wenn neben Ameisensäure nur noch niedere Säuren der Essigsäurereihe vorhanden sind. Ist die Abwesenheit störender nichtflüchtiger organischer oder anorganischer Stoffe nicht durchaus sicher, so ist sie stets auszuführen. Sie erfordert Aufmerksamkeit, da sie in mehrfacher Hinsicht zu Fehlern Anlaß geben kann.

Zunächst ist zu beachten, daß die Ameisensäure verhältnismäßig schwer mit Wasserdampf flüchtig ist, schwerer als Essigsäure und die nächstfolgenden höheren Säuren. Eine wasserlösliche Säure ist um so schwerer mit Wasserdampf überzutreiben, je größer das Volumen der Flüssigkeit ist, in dem sie sich gelöst befindet. Man wird daher, soweit andere Gesichtspunkte nicht entgegenstehen, das Volumen der Lösung möglichst klein wählen. Bei Versuchen, bei denen das Volumen der Flüssigkeit während der Wasserdampfdestillation unverändert gehalten wurde, ergab sich, daß aus verschiedenen Flüssigkeitsmengen mit 1 l Wasserdampfdestillat folgende Ameisensäuremengen in Prozenten der vorhandenen Ameisensäure übergehen:

Volumen der Ameisensäurelösung	Mit 1000 ccm Destillat gehen über etwa:
100 ccm	90—95 %
200 „	70—75 %
300 „	55—65 %
600 „	35—40 %

Je nach Wahl der Versuchsbedingungen (Schnelligkeit der Destillation, Form und Größe des Apparates, Konzentration der Ameisensäurelösung) schwanken die Werte etwas. Es läßt sich leicht annähernd berechnen, wieviel Prozent der vorhandenen Ameisensäure aus einem angegebenen Flüssigkeitsvolumen

übergehen, wenn man die Destillatmenge erhöht, denn von dem in der Flüssigkeit verbleibenden Rest geht mit jedem weiteren Liter Destillat wieder der entsprechende Prozentsatz über. Gehen bei 300 ccm Flüssigkeitsvolumen mit 1 l 60% der Ameisensäure über, so gehen mit 2 l Destillat etwa $60 + \frac{40 \cdot 60}{100} = 84\%$, mit 3 l Destillat etwa $60 + \frac{40 \cdot 60}{100} + \frac{16 \cdot 60}{100} = 93{,}6\%$ über. Bei einem Flüssigkeitsvolumen von 600 ccm sind etwa 10 l Destillat erforderlich, um 99% der vorhandenen Ameisensäure überzutreiben, während bei 50 ccm kaum 1 l nötig ist und bei 100 ccm 1,5 bis 2 l genügen. Von der absoluten Menge vorhandener Ameisensäure, von ihrer Konzentration, ist die Flüchtigkeit weniger abhängig; doch geht die Ameisensäure aus Lösungen geringer Konzentration etwas langsamer über als aus solchen höherer Konzentration. Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß es praktisch nicht möglich ist, Ameisensäure aus großen Flüssigkeitsmengen mit Wasserdampf quantitativ auszutreiben. Da es in vielen Fällen nicht möglich ist, die Lösung zu konzentrieren, so muß man entweder sich mit der Bestimmung in kleineren Volumen begnügen und die Wägung des Quecksilberchlorürs besonders exakt ausführen, oder man muß die Flüssigkeit in einzelnen Anteilen der Wasserdampfdestillation unterwerfen.

Die Wasserdampfdestillation nimmt man im allgemeinen in einem Kolben mit mittlerer Halslänge, der das 3 bis 5fache der zu destillierenden Flüssigkeit faßt, vor. Bei stark schäumenden Flüssigkeiten, z. B. bei Honiglösungen, sind langhalsige Kolben besser. Während der Dampfdurchleitung ist der Kolben zu erhitzen. Liegt eine sehr verdünnte Lösung vor oder sind zersetzliche Stoffe nicht vorhanden, so kann es statthaft sein, durch kräftiges Erhitzen das Volumen der Flüssigkeit während der Dampfdestillation zu verringern. Im allgemeinen wird man jedoch das Volumen unverändert halten, so dann, wenn man den zu untersuchenden Stoff zum Zwecke der Destillation mit Wasser verdünnen oder lösen oder aufschwemmen mußte, z. B. bei Fruchtsirupen, Honig, Leichenteilen und so weiter. Der Erhitzung des Kolbens, der das Untersuchungsobjekt enthält, ist besondere Aufmerksamkeit zu schenken,

denn die Zunahme der Flüssigkeitsmenge verlangsamt die Verflüchtigung der Ameisensäure, und die Verminderung der Flüssigkeit kann zu Zersetzungen führen. Werden dünne wässerige Lösungen der Destillation unterworfen, so kann man den Kolben über Flamme und Drahtnetz erhitzen; neigt die Flüssigkeit aber zum Ansetzen, z. B. bei Blutlösungen, oder enthält sie feste Teile, so nimmt man das Erhitzen im Ölbade vor. In jedem Falle ist die Erhitzung so zu leiten, daß die Flüssigkeitsmenge möglichst unverändert bleibt. Der Kolben ist mit einem Destillationsaufsatz zu versehen; als solcher genügt ein einfacher Kugelaufsatz (Fig. 1b), wenn die Rohre so weit gewählt sind (etwa 9 bis 10 mm lichte Weite), daß eine Stauung der kondensierten, zurückfließenden Flüssigkeit durch den entgegenströmenden Dampf nicht stattfindet. Der Destillationsaufsatz hat das Überreißen von Flüssigkeitströpfchen zu verhindern; besonders wichtig ist dies bei der Destillation zuckerhaltiger Lösungen, da auch Zuckerarten Quecksilberchlorid reduzieren. Man prüft daher die Wirksamkeit des zu benutzenden Destillationsaufsatzes, indem man eine Phosphorsäurelösung der Destillation unterwirft und sich überzeugt, daß in 1 l Destillat, das man einengt, mit Molybdänlösung keine Reaktion eintritt.

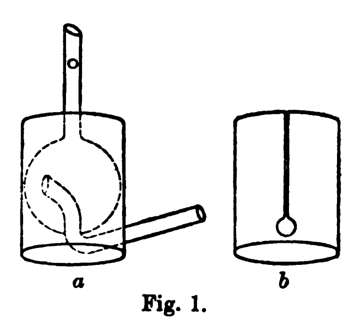


Fig. 1.

Um unnötiges Kondensieren von Dampf im Destillationsaufsatz und damit eine Verlangsamung des Überganges der Ameisensäure zu verhindern, überstülpe man den Destillationsaufsatz mit einer Kappe aus Karton oder Asbest (Fig. 1)[1]), die überall da zweckmäßig anzuwenden ist, wo durch die Destillationsaufsätze nur eine Befreiung des Dampfes von Flüssigkeitströpfchen, nicht eine Trennung von leicht und schwer flüchtigen Anteilen, erwünscht ist.

Zum Ansäuern der zu destillierenden Flüssigkeit ist Weinsäure zu empfehlen. Ist die Ameisensäure in freiem Zustande vorhanden, so genügt zum Ansäuern eine sehr ge-

[1]) Diese Wärmeschutzkappen fertigt die Firma Franz Hugershoff, Leipzig, an.

ringe Menge; völlig unterlasse man das Ansäuern auch in diesem Falle nicht, da vom Glas abgegebenes Alkali Ameisensäure binden kann. Sind neben ameisensaurem Salz Salze anderer flüchtiger Säuren zugegen, so ist so viel Weinsäure zuzusetzen, daß die gesamte flüchtige Säure in Freiheit gesetzt wird. Die Gegenwart zersetzlicher organischer Stoffe, vor allem tierischer und pflanzlicher Produkte, macht es notwendig, den Säurezusatz möglichst gering zu wählen. Nur dann, wenn derartige Stoffe nicht vorhanden sind, kann zum Ansäuern eine Mineralsäure dienen; alsdann ist Phosphorsäure am geeignetsten. Es ist zum Ansäuern statt Weinsäure auch Oxalsäure vorgeschlagen worden; ihre Verwendung ist nicht zweckmäßig, da sie — wenn auch gewöhnlich nur in ganz geringem Maße — sich selbst unter Ameisensäurebildung zersetzen kann[1]. Eine getrennte Bestimmung freier und salzförmiger Ameisensäure ist nur dann möglich, wenn andere freie Säuren oder Salze flüchtiger Säuren oder nicht neutral reagierende Salze nicht im Untersuchungsobjekt vorkommen. In den genannten Fällen verschiebt sich während der Destillation der Gleichgewichtszustand und damit das Verhältnis zwischen freier und salzförmiger Ameisensäure, so daß aus den gefundenen Werten ein Schluß auf das ursprüngliche Verhältnis nicht zu ziehen ist.

Es wurde bereits erwähnt, daß Mineralsäuren zum Ansäuern im allgemeinen nicht zu verwenden sind; vor allem gilt dies für die Gegenwart von Kohlenhydraten, aus denen sonst ganz erhebliche Mengen Ameisensäure entstehen können. In diesem Punkte ist bei früheren Arbeiten häufig gefehlt worden. Die Gegenwart von Zucker erheischt selbst bei Benutzung von Weinsäure Beachtung, da auch sie zu Zersetzungen Anlaß gibt, wenn ihre Konzentration sowie die des Zuckers zu hoch gewählt ist. Völlig ist die Ameisensäurebildung aus Zucker bei der Wasserdampfdestillation nicht zu vermeiden. Im einzelnen Falle wird man durch blinde Versuche ermitteln müssen, ob und in welchem Umfange Ameisensäure entsteht; je nach dem Zwecke und der geforderten Genauigkeit sind dann die Destillationsbedingungen zu wählen. Abgesehen von der Konzentration der Säure und der zersetzlichen

---

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 22, 97, 1911.

Stoffe wird man für möglichste Beschleunigung der Destillation sorgen, da die Zersetzung natürlich mit der Erhitzungsdauer zunimmt.

In den meisten Fällen wird bei zweckmäßiger Wahl der Bedingungen der entstehende Fehler vernachlässigt werden können. Nur bei dem Nachweise ganz geringer Ameisensäuremengen entstehen Schwierigkeiten, die später noch besonders erörtert werden sollen. Die Bildung von Ameisensäure bei der Wasserdampfdestillation von Invertzuckerlösungen wurde etwas eingehender verfolgt[1]). Es wurde z. B. eine Lösung von 80 g ameisensäurefreiem Invertzucker und 1,5 g Weinsäure zu 300 ccm Wasser der Wasserdampfdestillation unterworfen. In zwei nacheinander aufgefangenen Destillaten von je 500 ccm wurden 0,92 mg bzw. 1,11 mg Ameisensäure gefunden. Als die Hälfte einer gleichen Lösung in derselben Weise destilliert wurde, enthielten die beiden ersten Destillate von je 500 ccm 0,80 mg und 0,90 mg Ameisensäure. Kreis[2]) empfiehlt, um die Ameisensäurebilduug auf ein möglichst geringes Maß herabzudrücken, bei der Bestimmung in Fruchtsäften keinen Säurezusatz zu machen und aus dem Wasserbade zu destillieren. Wenn ein Überschuß freier, nichtflüchtiger Säure vorhanden, ist Säurezusatz entbehrlich. Die Erhitzung im Wasserbade hat aber den Nachteil, daß sich dadurch Kondensation von Dampf und somit Zunahme des Volumens der ameisensäurehaltigen Lösung nicht völlig vermeiden läßt.

Es erscheint nicht überflüssig, darauf hinzuweisen, daß Kohlenhydrate auch durch Behandlung mit Alkali Ameisensäure bilden, daß es daher nicht angängig ist, z. B. zuckerhaltige Lösungen zwecks Verseifung esterförmiger Ameisensäure mit Alkalien zu behandeln. Bei pflanzlichen und tierischen Stoffen ist hierauf Rücksicht zu nehmen. Infolge Nichtbeachtung dieser Tatsache sind mehrfach irrtümliche Ergebnisse erzielt worden. Wie man Ameisensäureester neben freier Ameisensäure bestimmen kann, wird später behandelt werden.

Die einfache Wasserdampfdestillation gestattet die Trennung der Ameisensäure von nichtflüchtigen Stoffen. Dagegen gehen die flüchtigen Stoffe, teils saurer, teils nichtsaurer Natur,

[1]) Vgl. Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 23, 258, 1912.

[2]) Chem.-Zeitg. 36, 814, 1912.

darunter solche, die stören können, in das Destillat über. Nur flüchtige stärkere Basen werden zurückgehalten. Man hat die Fehler, die durch nichtsaure flüchtige Stoffe entstehen können, dadurch auszuschalten gesucht, daß man das Destillat neutralisierte, zur Trockne dampfte und den Rückstand wieder mit Wasser aufnahm. Dieses Verfahren ist in vielen Fällen durchaus zweckmäßig und ausreichend, doch empfiehlt es sich, nicht mit Alkalihydroxyd zu neutralisieren, sondern das Destillat zunächst mit einem Überschuß von Calciumcarbonat bis auf ein geringes Volumen einzudampfen, dann zu filtrieren und das Filtrat zur Trockne zu bringen. Ist Formaldehyd zugegen, so genügt dieses nicht, es ist vielmehr notwendig, den Trockenrückstand eine Stunde auf 125 bis 130° zu erhitzen. Löb[1]) verfuhr zur Entfernung von Formaldehyd so, daß er die Flüssigkeit mit Calciumcarbonat neutralisierte, der Wasserdampfdestillation unterwarf ($1^1/_2$ bis 3 l Destillat), ansäuerte und wiederum mit Wasserdampf destillierte, bis die Ameisensäure übergegangen war.

Auf Grund zahlreicher Versuche habe ich vorgeschlagen[2]), die Trennung der Ameisensäure von flüchtigen nichtsauren Stoffen dadurch zu bewirken, daß man die mit den flüchtigen Stoffen beladenen Wasserdämpfe bei der fast stets notwendigen Wasserdampfdestillation durch eine im Sieden gehaltene Anschwemmung von Calciumcarbonat (oder Bariumcarbonat) leitet. Hierbei wird die Ameisensäure unter Entstehen eines nur ganz geringen Verlustes von der Anschwemmung zurückgehalten, während Aldehyde und andere nichtsaure Stoffe in das Destillat übergehen. Bei Vorhandensein von 100 mg Ameisensäure betrug der Verlust 1 bis 2 mg; von 5 bis 10 mg Ameisensäure gingen 0,5 mg verloren. Bei diesem Verfahren ist das Eindampfen einer großen Menge Filtrat unnötig; es besitzt ferner den Vorteil, daß die Trennung von nichtsauren Stoffen besser ist, als bei dem Eindampfen des Filtrates; dies zeigt sich vor allem dann, wenn die Menge der störenden nichtsauren Stoffe sehr groß ist. In schwierigen Fällen kann man die Wirksamkeit des Verfahrens noch dadurch erhöhen, daß man nach Be-

[1]) Diese Zeitschr. 17, 132, 1909.

[2]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 21, 9, 1911.

endigung der eigentlichen Destillation noch einige Zeit reinen Wasserdampf durch die Anschwemmung schickt. Der geringe Verlust von Ameisensäure kann in vielen Fällen leicht in Kauf genommen werden, da andererseits größere Sicherheit vorhanden ist, daß die gefundenen Produktionswerte wirklich nur von Ameisensäure herrühren. In der Nahrungsmittelchemie wird man vor allem so verfahren, wenn die Ameisensäurebestimmung dem Nachweise einer Verfälschung gilt und die Grundlage eines gerichtlichen Verfahrens werden kann. Hönig[1]) wandte die Destillation durch die Kalkanschwemmung mit Vorteil bei der Bestimmung von Ameisensäure in Sulfitzelluloseablauge an.

Zu den angegebenen Destillationsverfahren dient folgender Apparat[2]): Mit dem Dampfentwickler wird wie bei jeder Wasserdampfdestillation ein Kolben verbunden, durch dessen doppelt durchbohrten Stopfen ein fast bis auf den Boden reichendes, am Ende verengtes Dampfeinleitungsrohr und ein sicher wirkender Destillationsaufsatz führen. Dieser steht durch einen kurzen Gummischlauch mit dem Dampfeinleitungsrohr eines zweiten, langhalsigen Kolbens von etwa 500 ccm Inhalt in Verbindung. Das Dampfeinleitungsrohr des ersten Kolbens muß mehr Dampf durchlassen, als das Dampfeinleitungsrohr des zweiten Kolbens. Dieses besitzt zum Zwecke einer guten Dampfzerteilung am unteren, zugeschmolzenen Ende vier gebogene Röhrchen mit feiner Öffnung, in einer zum Rohr senkrecht stehenden Ebene geordnet; diese Einrichtung wurde zuerst von Stoltzenberg[3]) vorgeschlagen. Der zweite Kolben trägt ferner ebenfalls einen Destillationsaufsatz; dieser steht mit einem Liebigschen Kühler in Verbindung. Während der Destillation sind die Destillationsaufsätze mit Wärmeschutzkappen zu versehen. Als Dampfentwickler ist zweckmäßig die von mir angegebene, mit Dampfreiniger versehene Konstruktion zu verwenden. Sie hat den Vorzug, daß auch bei lebhaftem Sieden ein Überreißen von Wassertropfen und damit eine Verunreinigung des Kolbeninhaltes nicht statt-

[1]) Chem.-Zeitg. 36, 889, 1912.

[2]) Derselbe ist von der Firma Franz Hugershoff, Leipzig zu beziehen.

[3]) Chem.-Zeitg. 32, 770, 1908.

findet; ferner gestattet sie, ohne Unterbrechung des Siedens und ohne Auseinandernahme der Schlauchverbindungen jederzeit die Dampfdurchleitung dadurch zu unterbrechen, daß man den Dampf durch ein besonderes Ablaßrohr ins Freie läßt. Die Anordnung des gesamten Apparates ist aus der untenstehenden Zeichnung zu ersehen (Fig. 2).

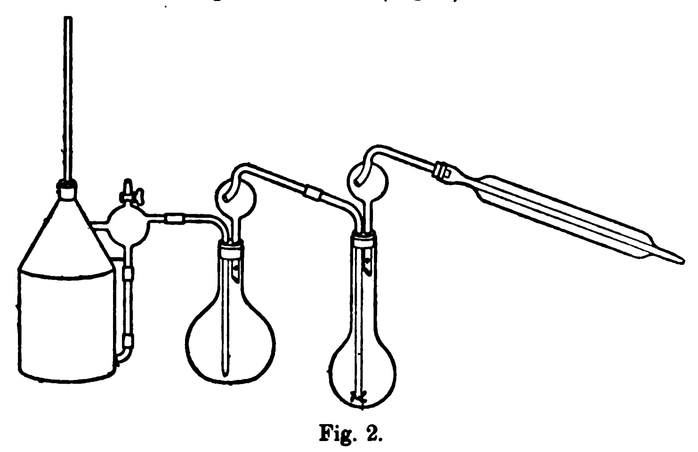


Fig. 2.

In dem ersten Kolben, dessen Flüssigkeitshöhe während der Destillation durch Erhitzen — entweder mit Flamme und Drahtnetz oder im Ölbade — möglichst gleichmäßig gehalten wird, befindet sich die saure, von Ameisensäure zu befreiende Flüssigkeit.

In dem zweiten Kolben befindet sich die Calciumcarbonatanschwemmung, durch die mittels des bis auf den Boden reichenden Dampfzerteilers der Dampf, der durch den ersten Kolben hindurchgegangen ist, geleitet wird. Auch die Flüssigkeitsmenge des zweiten Kolbens wird durch Erhitzen mit Flamme und Drahtnetz während des Versuches gleich groß erhalten. Als Anschwemmung genügt im allgemeinen eine Mischung von 1 g Calciumcarbonat und 100 ccm Wasser. Sind größere Mengen flüchtiger Säure vorhanden (z. B. bei Essig), so nehme man soviel Calciumcarbonat, daß ein Überschuß von 1 g vorhanden ist.

Die Ausführung der Destillation geschieht in folgender Weise: Man beschickt den Apparat und stellt die Verbindungen her, während man den Inhalt des Dampfentwicklers

zum Sieden bringt. Alsdann erhitzt man den Inhalt der beiden Kolben und beginnt mit der Dampfdurchleitung, ehe der Inhalt des ersten Kolbens siedet. Sind größere Mengen flüchtiger Säure zugegen, so ist der Dampf zunächst langsam durchzuleiten, damit im zweiten Kolben keine zu stürmische Kohlensäureentwicklung, die zum Überschäumen führt, stattfindet. In anderen Fällen destilliere man mit kräftigem Wasserdampfstrome unter Anwendung eines Dampfdruckes von 50 bis 100 cm Wassersäule. Einzelne Untersuchungsobjekte, z. B. Honiglösungen, neigen zum Schäumen. Durch Benutzung eines größeren Destillationskolbens sowie dadurch, daß man die Destillation für einige Augenblicke unterbricht, kann man der Schwierigkeiten leicht Herr werden. Zuweilen schäumt auch die Calciumcarbonatanschwemmung, ohne jedoch bei Anwendung eines größeren Kolbens die Destillation unmöglich zu machen.

Das im Liebigschen Kühler entstehende Destillat, das unter Umständen zur Prüfung auf Formaldehyd oder andere flüchtige Stoffe verwandt werden kann, sammelt man in einer Vorlage, um die Menge des durchgegangenen Dampfes feststellen zu können.

Nach Beendigung der Destillation filtriert man die Calciumcarbonatanschwemmung und wäscht den Rückstand mit heißem Wasser gut aus. Das Filtrat, das bei sehr kleinen Ameisensäuremengen etwas einzudampfen ist, verwendet man ganz oder teilweise zur Ameisensäurebestimmung. Im allgemeinen kann es ohne weiteres für das Quecksilberchloridverfahren benutzt werden. Die Fälle, in denen noch eine vorherige weitere Behandlung erforderlich ist, werden im nachfolgenden besprochen werden. Das Filtrat muß völlig farblos oder wenigstens fast farblos sein; ist es gefärbt, so hat möglicherweise bei der Destillation eine Zersetzung von Zucker stattgefunden, oder es kann ein störender Stoff, z. B. Glyoxylsäure, zugegen sein.

Die Destillation durch eine Calciumcarbonatanschwemmung schließt Fehler durch flüchtige Säuren nicht aus. Ich habe eingehende Versuche darüber angestellt, welche Säuren stören und wie die Störungen beseitigt werden können, und bin zu folgenden Ergebnissen gekommen:

Von anorganischen Säuren ist die schweflige Säure eine Fehlerquelle, da sie Quecksilberchlorid ebenfalls zu Chlorür

reduziert. Man prüfe daher das Untersuchungsobjekt oder einen Teil des Filtrates der Calciumcarbonatanschwemmung in der bekannten Weise mittels Kaliumjodatstärkepapier.

Ist schweflige Säure zugegen, so verfährt man in folgender Weise: Das auf etwa 100 ccm eingeengte neutrale Destillat oder das Filtrat der Calciumcarbonatanschwemmung versetzt man mit 1 ccm Normalnatronlauge und 5 ccm 3 %igem Wasserstoffsuperoxyd und läßt damit 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Alsdann fügt man zur Zerstörung des überschüssigen Wasserstoffsuperoxydes etwas breiförmiges Quecksilberoxyd hinzu, das man in der Siedehitze durch Eingießen von Quecksilberchloridlösung in überschüssige Natronlauge, Auswaschen durch mehrmaliges Übergießen mit heißem Wasser, Absetzenlassen und Abgießen und zuletzt durch Sammeln auf einem Filter gewonnen hat. Das Quecksilberoxyd ist nur dann genügend wirksam, wenn es frisch bereitet oder höchstens einige Wochen alt und in feuchtem Zustande aufbewahrt ist. Das Quecksilberoxyd ist im Überschusse anzuwenden; man erkennt dies daran, daß ein Teil seine Farbe unverändert erhält. Nach halbstündigem Stehen wird vom Quecksilber und Quecksilberoxyd abfiltriert, der Rückstand ausgewaschen und das Filtrat nach dem Neutralisieren mit Salzsäure zur Ameisensäurebestimmung verwandt.

Von flüchtigen organischen Säuren wurden Sorbinsäure, Glyoxylsäure, Lävulinsäure sowie mehrere Säuren der aromatischen Reihe als solche erkannt, die unter Umständen Störungen bewirken können. Sorbinsäure kommt nur in unreifen Vogelbeeren vor, kommt also im allgemeinen nicht in Betracht. Glyoxylsäure, die niederste Aldehydsäure, soll in unreifen Früchten und zuweilen im Harn vorkommen. Bei ihrer Gegenwart ist das Filtrat der Calciumcarbonataufschwemmung gelbbraun gefärbt. Die Glyoxylsäure kann durch Behandlung mit Zink in schwefelsaurer Lösung unschädlich gemacht werden. Die ameisensäure- und glyoxylsäurehaltige Lösung, deren Volumen etwa 20 bis 25 ccm betragen soll, wird in einem langhalsigen, mit Rückflußkühler versehenen Kolben mit 2 g grob gepulvertem Zink und 0,5 ccm konzentrierter Schwefelsäure 3 Stunden zu gelindem Sieden erhitzt; dann wird noch einmal die gleiche Menge Schwefelsäure zu-

gefügt und nochmals 1 bis 2 Stunden erhitzt. Die Flüssigkeit wird mit einigen Tropfen verdünnter Salzsäure versetzt, filtriert und mit Wasser verdünnt. Alsdann dient sie zur Ameisensäurebestimmung. Lävulinsäure dürfte ebenfalls nur selten vorkommen. Sie bildet ein schwer lösliches Quecksilbersalz und stört daher, wenn sie in größerer Menge vorhanden ist. Ihr Quecksilbersalz ist in Salzsäure leicht löslich. Fügt man daher der Flüssigkeit, die mit Quecksilberchlorid erhitzt war und die Kalomelausscheidung enthält, überschüssige Salzsäure zu (bei Anwendung von 3 g Natriumacetat und 100 ccm Flüssigkeit 5 ccm Salzsäure vom spez. Gewicht 1,124) und läßt dann unter nochmaligem Umschwenken $^1/_4$ Stunde auf dem Wasserbade stehen, so geht die durch Lävulinsäure bedingte Ausscheidung völlig in Lösung, während das Quecksilberchlorür unverändert bleibt. Bei Gegenwart größerer Mengen Zimtsäure, die praktisch nicht vorkommen dürften, scheidet sich beim Erkalten der Zersetzungsflüssigkeit eine schwer lösliche Quecksilberverbindung aus; filtriert man heiß, wird die Genauigkeit der Bestimmung nicht beeinflußt. Salicylsäure gibt Ausscheidung einer Quecksilberverbindung, wenn der Zersetsungsflüssigkeit Natriumchlorid nicht zugesetzt ist. Fumarsäure erfordert außer dem Natriumchloridzusatz einen nachträglichen Zusatz von Salzsäure, wie er bei Lävulinsäure angegeben ist.

Die störenden Stoffe sind also teils solche, die ebenfalls Quecksilberchlorid reduzieren — schweflige Säure, Sorbinsäure und Aldehydsäuren —, teils solche, die mit Quecksilberchlorid unlösliche Verbindungen eingehen. Diese erkennt man stets an dem abweichenden Aussehen des Niederschlages, der nicht krystallinisch und nicht weiß oder gelblich ist wie Quecksilberchlorür. Genügte der vorgeschlagene Natriumchloridzusatz nicht, um die störende Ausscheidung zu verhindern, so kommt man durch nachträglichen Salzsäurezusatz zum Ziel. Diese Notwendigkeit wird nur in sehr seltenen Fällen eintreten. Von den Quecksilberchlorid reduzierenden Säuren ist die schweflige Säure durch eine einfache Vorprüfung zu erkennen, Sorbinsäure kommt nur in Vogelbeeren vor und die Aldehydsäuren, wenigstens die wohl allein in Betracht kommende Glyoxylsäure, färbt das Destillat.

Besteht dennoch einmal der Verdacht, daß eine mit Queck-

silberchlorid entstandene Ausscheidung nur teilweise durch Ameisensäure bedingt ist — ob überhaupt Ameisensäure vorhanden, ergibt sich bei der qualitativen Prüfung —, so macht man eine Kontrollbestimmung am besten mit dem Kohlenoxydverfahren.

Das Kaiserliche Gesundheitsamt[1]) läßt bei der Bestimmung der Ameisensäure in Essig die Destillation durch eine Calciumcarbonataufschwemmung vornehmen. Das Filtrat derselben läßt es zur Trockne dampfen, den Rückstand 1 Stunde lang im Lufttrockenschrank auf 125 bis 130° erhitzen, in etwa 100 ccm Wasser lösen und die Lösung zweimal mit je 25 ccm Äther ausschütteln. Nach Verjagung des Äthers durch vorsichtiges Erwärmen auf dem Wasserbade wird die Lösung mit Quecksilberchlorid und Natriumacetat erhitzt. Die vom Kaiserlichen Gesundheitsamt vorgeschlagene Behandlung des Filtrates der Calciumcarbonataufschwemmung bezweckt offenbar eine Ausschaltung störender Stoffe; nach meinen bisherigen Erfahrungen wird der gleiche Zweck einfacher und besser durch den Zusatz von Natriumchlorid zur Zersetzungsflüssigkeit erreicht.

Beim forensischen Ameisensäurenachweis ist zu beachten, daß Chloralhydrat, das im Mageninhalt enthalten sein könnte, leicht in Ameisensäure und Chloroform zerfällt. Dies ist beim Auftreten von Chloralhydrat- oder Chloroformgeruch im Destillat zu beachten. Chloralhydrat läßt sich sogar quantitativ genau bestimmen durch Feststellung der daraus gebildeten Ameisensäuremenge. Man läßt die Chloralhydratlösung einige Minuten mit einem Überschuß von Alkali stehen, neutralisiert genau, verjagt das Chloroform durch schwaches Erwärmen und bestimmt dann die Ameisensäure. Im allgemeinen läßt sich das Chloralhydrat hierbei einfacher aus dem Alkaliverbrauch berechnen; doch kann die alkalimetrische Bestimmung unter Umständen infolge Gegenwart anderer Stoffe nicht möglich sein. Die alkalische chloroformhaltige Flüssigkeit darf nicht erwärmt werden, weil sich sonst durch Einwirkung des Alkalis auf das Chloroform weitere Ameisensäure bilden könnte.

---

[1]) Entwürfe zu Festsetzungen über Lebensmittel, Heft 3: Essig und Essigessenz S. 17. Berlin 1912.

Hat man die Ameisensäure in die Form einer Lösung gebracht, die sich zur Behandlung mit Quecksilberchlorid eignet, also im allgemeinen in die Form eines eingeengten Destillates oder des Filtrates der Calciumcarbonataufschwemmung, so nimmt man die eigentliche Ameisensäurebestimmung in folgender Weise vor: Die durch einige Tropfen verdünnte Salzsäure schwach angesäuerte Ameisensäurelösung wird mit Natriumacetat, Natriumchlorid und Quecksilberchlorid versetzt und in einem mit Rückflußrohr versehenen Erlenmeyer-Kolben 2 Stunden im siedenden Wasserbade erhitzt. Das ausgeschiedene Quecksilberchlorür wird auf gewogenem Filter oder in einem gewogenen Filtertiegel gesammelt, mit warmem Wasser und zuletzt mit Alkohol und Äther ausgewaschen, 1 Stunde im Wasserbadtrockenschrank getrocknet und gewogen. Durch Multiplikation des ermittelten Gewichtes mit 0,0975 ergibt sich die Ameisensäuremenge.

Der Reaktionsverlauf zwischen ameisensaurem Salz und Quecksilberchlorid ist folgender:

$$HCOONa + 2\,HgCl_2 = 2\,HgCl + CO_2 + NaCl + HCl.$$

Die Reaktion verläuft vollständig nur in einer Lösung, die wenig Wasserstoffionen enthält. In stark saurer Lösung findet überhaupt keine Reaktion statt, in mäßig saurer Lösung erfolgt sie sehr langsam. Das Nichteintreten eines Niederschlages beruht nicht etwa auf einem In-Lösung-halten des Quecksilberchlorürs durch die Salzsäure, sondern auf einer Hinderung der Oxydation durch das Quecksilberchlorid. Bei genügendem Natriumacetatzusatz ist die Umsetzung nach 2stündigem Erhitzen beendet. Die Menge des Natriumacetats ist so groß zu nehmen, daß nicht nur die bei der Reaktion freiwerdende Salzsäure gebunden wird, sondern daß durch überschüssiges Natriumacetat auch die Dissoziation, die Wasserstoffionenkonzentration der durch die Salzsäure in Freiheit gesetzten Essigsäure erheblich zurückgedrängt wird. Der Natriumacetatzusatz wurde schon von den ersten Autoren, die Quecksilberchlorid anwandten, von Portes und Ruyssen, vorgeschrieben, doch in unzureichender Menge. Spätere Bearbeiter des Quecksilberchloridverfahrens übersahen den Wert des Natriumacetatzusatzes und suchten den glatten Reaktionsverlauf durch großen

Quecksilberüberschuß oder lang andauerndes Erhitzen (Lieben, Coutelle) oder durch mehrmaliges Neutralisieren (Franzen und Greve) zu erreichen. Auerbach und Plüddemann stellten fest, daß bei Ameisensäuremengen bis zu 125 mg 3 g Natriumacetat, bei größeren Ameisensäuremengen entsprechend mehr hinzuzusetzen sei. Bei kleinen Ameisensäuremengen genügen 1 bis 2 g Natriumacetat. Übergroße Acetatmengen erzeugen dann, wenn kein Natriumchlorid zugesetzt wird, etwas zu hohe Ameisensäurewerte. Dies ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß der Niederschlag alsdann geringe Mengen Mercuroacetat enthält. Bei Anwesenheit von genügend Natriumchlorid ist dessen Bildung in merklicher Menge nicht möglich, da sich Mercuroacetat und Natriumchlorid ziemlich leicht zu Mercurochlorid und Natriumacetat umsetzen.

Das Natriumacetat setzt man der Zersetzungsflüssigkeit am einfachsten in fester Form zu. Vorher hat man sich durch einen blinden Versuch zu überzeugen, daß es völlig ameisensäurefrei ist. Ein Natriumacetatzusatz ist natürlich nicht erforderlich, wenn die Flüssigkeit infolge hohen Essigsäuregehaltes des untersuchten Stoffes, wie z. B. bei Essig, bereits entsprechende Mengen von Acetat enthält.

Daß von Buchner, Meisenheimer und Schade statt Natriumacetat Natriumnitrit angewandt wurde, ist bereits erwähnt. Auch dieses Verfahren wurde nachgeprüft. Wenn man etwa die gleichen Mengen Natriumnitrit anwendet, wie für Natriumacetat vorgeschrieben ist, so verläuft die Reaktion zwischen Ameisensäure und Quecksilberchlorid ebenfalls quantitativ. Vorzüge hatte jedoch die Natriumnitritanwendung nicht, vielmehr können durch die Einwirkung der salpetrigen Säure auf organische Stoffe, z. B. auf Salicylsäure, störende Nebenreaktionen eintreten. Auch die Stickoxydentwicklung ist unangenehm und zwingt, im Abzuge zu arbeiten.

Der Zusatz von Natriumchlorid zur Zersetzungsflüssigkeit ist eine Verbesserung gegenüber meiner ursprünglichen Vorschrift, die nur bei Salicylsäuregegenwart Natriumchlorid zusetzen ließ. Auf diese Weise wird ein reineres Quecksilberchlorür erhalten. Je 100 ccm der Flüssigkeit sollen 1,5 bis 2 g Natriumchlorid enthalten; die Zugabe kann in fester Form erfolgen; das in der Quecksilberchloridlösung enthaltene Natrium-

chlorid ist in Rechnung zu ziehen. Unter den angegebenen Bedingungen beeinträchtigt der Zusatz die Genauigkeit der Bestimmung nicht.

Infolge des Natriumchloridzusatzes ist die Quecksilberchloridmenge gegenüber meiner ersten Vorschrift zu erhöhen, denn durch das Natriumchlorid wird die Dissoziation des Quecksilberchlorids, die ohnehin gering ist, weiter zurückgedrängt, die Reaktion somit verlangsamt. Durch Vergrößerung des Überschusses wird dies wieder ausgeglichen. Man setzt daher etwa das 25fache der vorhandenen Ameisensäure, also doppelt so viel als theoretisch erforderlich ist, an Quecksilberchlorid zu und verwendet auf 100 ccm Zersetzungsflüssigkeit etwa 1,5 bis 2 g Quecksilberchlorid. Ein Teil Ameisensäure verbraucht 11,80 Teile $HgCl_2$ und bildet damit 10,26 Teile HgCl. Das Quecksilberchlorid darf nicht in fester Form zugesetzt werden, vielmehr verwendet man am besten eine durch Absetzenlassen geklärte, mit Hilfe von Natriumchlorid (etwa $^1/_8$ des Quecksilberchloridgewichtes) hergestellte 10 oder $20^0/_0$ige Lösung.

Das Volumen der Zersetzungsflüssigkeit kann in weiten Grenzen schwanken; je nach der Menge der Ameisensäure wählt man es zu 50 bis 300 ccm. Sind mehr als 250 mg Ameisensäure vorhanden, so ist es noch größer zu nehmen. Die Löslichkeit des Quecksilberchlorürs ist so gering, daß man selbst bei geringen Ameisensäuremengen, z. B. bei Mengen von 10 mg, ohne Bedenken 100 ccm Flüssigkeit anwenden und mit größerer Wassermenge auswaschen darf.

Ein Ansäuern der Lösung ist nicht unbedingt nötig, doch darf die Lösung nicht alkalisch sein. Filtrate der Calciumcarbonatanschwemmung säuert man am besten stets schwach an. Hierzu ist Salzsäure zu nehmen. Jegliche Verwendung von Essigsäure ist bei Ameisensäurebestimmungen zu vermeiden, da ameisensäurefreie Essigsäure im Handel kaum erhältlich ist. Die in den Laboratorien gebräuchliche Essigsäure enthält stets Ameisensäure. Natriumacetat ist dagegen im allgemeinen ameisensäurefrei.

Als Zersetzungsgefäße nimmt man Erlenmeyer-Kolben, die etwa das doppelte Volumen der Zersetzungsflüssigkeit fassen. Entweder verwendet man Kolben mit eingeschliffenen, in ein

Rohr ausgezogenen Glasstopfen, oder man setzt ein etwa 30 bis 40 cm langes Glasrohr mittels eines glatten Gummistopfens auf. Dieses Rückflußrohr hat den Zweck, Verluste an Ameisensäure und ein Eindampfen der Zersetzungsflüssigkeit zu verhindern.

Das Erhitzen der Zersetzungskolben erfolgt im siedenden Wasser- oder Dampfbade. Man streift einige engere Ringe des Bades über den Kolben und hängt ihn dann mittels Stativ und Klammer so in das Bad ein, daß der übergestreifte engste Ring den Kolben dicht umschließt und daß die gesamten Ringe eine schließende Fläche bilden. So wird wohl der untere, die Flüssigkeit enthaltende Teil des Kolbens erhitzt, nicht aber der obere Teil. Erhitzen auf dem Wasserbade genügt nicht.

Nach 2stündigem Erhitzen ist die Reaktion beendet. Glasrohr und Stopfen werden mit Wasser aus- bzw. abgespült, da das Quecksilberchlorür zuweilen in die Höhe, selbst in das Rückflußrohr hineinkriecht. Das Abfiltrieren des Niederschlages kann noch in der Wärme erfolgen. Das Sammeln geschieht entweder auf einem getrockneten Filter oder — vor allem bei größeren Mengen — in einem Porzellan- oder Platinfiltertiegel. Der Niederschlag wird mit warmem Wasser sorgfältig ausgewaschen; die Wandung des Zersetzungskolbens muß mit dem Gummiwischer gut abgerieben werden. Wäscht man den Niederschlag mit Alkohol und Äther nach, so genügt, wenn nicht ungewöhnlich große Mengen vorliegen, 1stündiges Trocknen bei 95 bis 100°. Bei großen Niederschlagsmengen oder sehr genauen Bestimmungen kleiner Mengen schließt man noch mehrstündiges Trocknen über Phosphorpentoxyd an. Im letzteren Falle — bei möglichst genauen Bestimmungen kleiner Mengen — muß Filter oder Tiegel vorher ebenso behandelt werden; die Wägung muß alsdann in einem Wägeglas erfolgen.

Bei der Berechnung der Analysen ist zu berücksichtigen, daß seit 1912 für Quecksilber das Atomgewicht 200,6 (früher 200,0) angenommen ist. Zur Umrechnung des Quecksilberchlorürs auf Ameisensäure ist daher jetzt der Faktor 0,0975 (früher 0,0977) zu verwenden.

Die Genauigkeit des Verfahrens ergibt sich aus folgenden Analysen:

Volumen der Flüssigkeit	Zusatz von Quecksilberchlorid	Zusatz von Natriumacetat	Zusatz von Natriumchlorid	Ameisensäure	
				angewandt	gefunden
ccm	g	g	g	mg	mg
100	2	3,0	2	9,1	9,3
100	2	3,0	2	33,1	33,1
100	2	3,0	2	127,0	126,9
150	3	4,0	3	179,6	179,5
350	6	7,5	5	284,6	285,2
350	10	7,5	5	332,5	333,4

Es bleiben nunmehr noch einige besondere Fälle zu erörtern, nämlich die gleichzeitige Bestimmung von Ameisensäure und Formaldehyd, die gleichzeitige Bestimmung von freier und esterförmiger Ameisensäure und der Nachweis und die Bestimmung sehr geringer Ameisensäuremengen bei Gegenwart zersetzlicher Stoffe.

Für die gleichzeitige Bestimmung von Ameisensäure und Formaldehyd haben Auerbach und Plüddemann[1]) ein gutes Verfahren ausgearbeitet. Man bestimmt zunächst das Formaldehyd nach der Wasserstoffsuperoxydmethode, wobei es in Ameisensäure übergeführt wird, deren Menge man acidimetrisch feststellt; alsdann bestimmt man die Gesamtameisensäure nach dem Quecksilberchloridverfahren und findet durch Abzug der dem Formaldehyd äquivalenten Ameisensäuremenge die ursprünglich vorhandene Ameisensäure. Bezüglich der Ausführung der immerhin nur selten vorkommenden Bestimmung sei auf die Originalarbeit verwiesen.

Die Bestimmung von freier (bzw. salzförmiger) und esterförmiger Ameisensäure nebeneinander, die z. B. bei Edelbranntweinen in Frage kommt, kann man in folgender Weise vornehmen: Die zu untersuchende schwach saure Flüssigkeit wird mit einer, die vorhandene freie Ameisensäure um ein Vielfaches übertreffenden Menge Natriumacetat versetzt. Dieser Natriumacetatzusatz — meist dürften 1 bis 2 g genügen — hat den Zweck, bei dem nachfolgenden Abdestillieren der Ester das Übergehen freier Ameisensäure zu verhindern. Man destilliert nun die flüchtigen Ester ab. Dann säuert man die Flüssigkeit mit Weinsäure an, wobei für je 1 g zugesetzten

[1]) Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamte **30**, 205, 1909.

Natriumacetats 2 g Weinsäure anzuwenden sind, verbindet den Destillationskolben mit einem eine Calciumcarbonatanschwemmung enthaltenden Kolben und destilliert mit Wasserdampf in der früher beschriebenen Weise. Im Filtrate der Anschwemmung bestimmt man die Ameisensäure. Der gefundene Wert gibt die freie Ameisensäure an.

Das erste, esterhaltige Destillat verseift man, indem man es mit einer abgemessenen, überschüssigen Menge $^{n}/_{4}$ oder $^{n}/_{10}$-Alkalilauge 24 Stunden bei gewöhnlicher Temperatur stehen läßt. Durch Zurücktitrieren erfährt man die Gesamtestermenge. Die neutrale Flüssigkeit wird auf etwa 50 ccm eingeengt und nach dem Ansäuern mit Phosphorsäure der Wasserdampfdestillation unter Durchleiten der Dämpfe durch eine Calciumcarbonatanschwemmung unterworfen. Die im Filtrate derselben gefundene Ameisensäure ist die als Ester vorhanden gewesene Ameisensäure.

Nachweis und Bestimmung sehr kleiner Ameisensäuremengen gestalten sich schwierig, wenn im Untersuchungsobjekt Stoffe vorhanden sind, die bei der Wasserdampfdestillation Zersetzung unter Ameisensäurebildung erleiden. Dies ist z. B. stets bei Gegenwart von Zuckerarten der Fall. Selbst ganz schwach saure Invertzuckerlösungen erleiden bei der Wasserdampfdestillation eine Zersetzung: Ameisensäurebildung ist dabei unvermeidlich. Sollen Spuren von Ameisensäure nachgewiesen werden, so genügt somit der Nachweis, daß das Destillat ameisensäurehaltig ist, nicht, denn es ist aus der qualitativen Reaktion nicht zu ersehen, ob es sich um ursprünglich vorhandene oder um bei der Destillation gebildete Ameisensäure handelt. Nur ganz vereinzelt ist dies bisher beachtet worden. So fand Lieben[1]), daß bei der Destillation grüner Pflanzenteile mit Wasserdampf das Destillat stets Ameisensäure enthält, daß diese aber nicht in den Pflanzen enthalten ist, sondern aus den darin vorkommenden Kohlenhydraten unter dem Einfluß des angesäuerten Wassers entsteht. Irrigerweise glauben dagegen Curtius und Franzen[2]) neuerdings deshalb zu dem Schluß berechtigt zu sein, daß Ameisensäure in Hainbuchenblättern enthalten sei,

[1]) Chem. Centralbl. **2**, 891, 1898.

[2]) Sitzungsber. d. Heidelberger Akad. Math.-naturw. Klasse. **1912**, A 6. S. 6.

weil sie im Destillat von 1500 kg Blättern etwa 1,5 g Amseisensäure, also auf 1 kg 1 mg (!) fanden.

In einzelnen Fällen wird es möglich sein, Gegenwart oder Abwesenheit von Ameisensäure dadurch festzustellen, daß man eine ameisensäurenfreie, aber im übrigen gleich zusammengesetzte Lösung in genau gleicher Weise wie das eigentliche Untersuchungsobjekt der Destillation unterwirft. Man bestimmt dann bei beiden Destillationen die Ameisensäuremengen und vergleicht diese miteinander. In vielen Fällen wird dieses Verfahren aber nicht möglich oder unsicher sein. Alsdann führen Überlegungen zum Ziel, die ich mit Erfolg zur Entscheidung der Frage, ob Bienenhonig Ameisensäure enthält oder nicht, anwandte[1]: Ist in einer Flüssigkeit Ameisensäure nicht fertig gebildet, sondern entsteht sie erst bei der Wasserdampfdestillation durch Zuckerzersetzung, so muß in gleichgroßen, nacheinander aufgefangenen Fraktionen des Destillates die Ameisensäuremenge entweder gleich sein oder allmählich zunehmen. Bedingung ist, daß die Zuckermenge im Vergleich zum Zersetzungsprodukt sehr groß ist, so daß die Verminderung der Zuckermenge durch die Zersetzung nicht ins Gewicht fällt. Dagegen muß bei der Destillation einer Flüssigkeit, die Ameisensäure enthält, in der aber keine Neubildung stattfindet, in den aufeinander folgenden Fraktionen die Ameisensäure abnehmen. Bei Wahl geeigneter Destillationsbedingungen, das heißt bei richtiger Wahl der Mengen der zu destillierenden Flüssigkeit und der getrennt aufzufangenden Destillate gelingt es, so den Nachweis selbst sehr geringer Ameisensäuremengen zu erbringen. Man wird in jedem einzelnen Falle die günstigsten Bedingungen durch Versuche ermitteln müssen. Die Menge der fertig gebildeten Ameisensäure läßt sich in solchen Fällen durch vergleichende Versuche wenigstens annähernd ermitteln.

[1]) Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel **23**, 260, 1912.

Die Bedeutung der Lipoide für die Entstehung der bioelektrischen Potentialdifferenzen bei gewissen pflanzlichen Organen.

Von

Jacques Loeb und Reinhard Beutner.

(Aus dem Rockefeller Institute, New York.)

(Eingegangen am 23. April 1913.)

1. Es schien von Interesse, die Stoffe kennen zu lernen, die die bioelektrischen Erscheinungen bestimmen. Diese Aufgabe konnte ausgeführt werden, da wir in den vorausgehenden Arbeiten die sehr charakteristischen Eigentümlichkeiten der Potentialdifferenzen an der Grenze pflanzlicher und tierischer Organe und den Zuleitungsflüssigkeiten kennen gelernt haben[1]).

Wir gehen von folgender Kette aus:

Hg | HgCl m-KCl | lebendes Organ | KCl (variable Konzentration) | m-KCl HgCl | Hg.

Eine zunehmende Verdünnung der variablen KCl-Lösung macht die rechte Seite positiver. Das gilt nicht nur für KCl, sondern für jede wässerige Lösung eines Alkali- und Erdalkalisalzes. Die bioelektrischen Potentialdifferenzen sind also reversibel für Kationen jeder Art. Wasserlösliche Säuren sind negativ im Vergleich mit wasserlöslichen Salzen der gleichen Konzentration, und zwar ist die Potentialdifferenz von der Größenordnung der EMK des Verletzungsstromes.

Die Größe der Änderung der Potentialdifferenz mit der Änderung der Konzentration der Zuleitungsflüssigkeit ist in einem großen Bereich der Konzentration beinahe so groß, wie man nach der Nernstschen Formel für Potentialdifferenzen erwarten sollte. Ferner beobachteten wir, daß die biologische

---

[1]) Loeb und Beutner, diese Zeitschr. **41**, 1; **44**, 303, 1912.

Potentialdifferenz mit steigender Konzentration einem Grenzwert zustrebt. Beutner hat für diese Vorgänge eine Theorie entwickelt, wonach dieselben dadurch zustande kommen, daß Spuren der Elektrolyte der Lösung mit einem Elektrolyten der wasserunlöslichen Phase chemische Reaktionen eingehen. Er hat nachweisen können, daß an der Grenze von wasserunlöslichen Säuren (z. B. Salicylsäure in Salicylaldehyd gelöst) und wässerigen Lösungen Potentialdifferenzen auftreten, die eine ähnliche Abhängigkeit von dem Konzentrationseinfluß zeigen wie pflanzliche und tierische Organe[1]).

Es fragte sich nun, welche Stoffe in den lebenden Organen die biologischen Potentialdifferenzen und die vorhin geschilderten Eigentümlichkeiten derselben unter verschiedenen Bedingungen bestimmen.

2. Versuche mit Eiweißkörpern. Die erste Möglichkeit, die sich bot, war die, daß feste Eiweißkörper die wasserunlösliche Phase bilden. Diese Möglichkeit wurde an fester Gelatine und an geronnenem Hühnereiweiß geprüft. Das Resultat war völlig negativ. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei unseren früheren Versuchen, nur daß die festen Eiweißkörper die Stelle der lebenden Organe in der Kette einnahmen.

Kette:

Hg | HgCl $^m/_{10}$-NaCl | festes Eiweiß | NaCl (variable Konzentration) | $^m/_{10}$-NaCl HgCl | Hg.

Tabelle I.

Potentialdifferenz an der Grenze von geronnenem Eiweiß und NaCl verschiedener Konzentration.

Konzentration der NaCl-Lösung	EMK Volt
$^m/_{10}$	— 0,002
$^m/_{1000}$	— 0,005
$^m/_{100}$	— 0,008
$^m/_{10}$	— 0,005

Wie man sieht, fehlt jeder Konzentrationseinfluß, der für lebende Organismen charakteristisch ist, nicht einmal das Positivwerden mit abnehmender Konzentration tritt in die Erscheinung.

---

[1]) Beutner, diese Zeitschr. 47, 73, 1912; Zeitschr. f. Elektrochem. 19, 1913.

Ebenso resultatlos verliefen die Versuche mit Gelatine. Wir dürfen also sagen, daß die festen Eiweißkörper nicht die wasserunlösliche Phase bei der Entstehung der bioelektrischen Potentialdifferenzen bilden.

3. Versuche mit Lecithin. Die Versuche mit Lecithin ergaben eine überraschende Übereinstimmung mit denen am Apfel oder dem Blatt der Gummipflanze.

Es war nötig, das Lecithin (wie auch die anderen weiterhin zu besprechenden Lipoide) in ein Lösungsmittel zu bringen, um die Phasengrenzkräfte zu beobachten; da ja das Lecithin eine schmierige Masse ist, mit der sich nicht gut eine kontinuierliche trennende Oberfläche herstellen läßt. Als Lösungsmittel diente meist Guajacol. Die Methode war die gleiche wie die in Beutners früheren Versuchen beschriebene. Dieselbe bestand darin, daß der kleinere weite Schenkel eines U-Rohres mit Guajacol gefüllt wurde, während der längere Schenkel mit m-KCl gefüllt war und mit der Elektrode (bestehend aus Hg HgCl $^{m}/_{1}$-KCl) verbunden war. Der kleine Schenkel mit Guajacol wurde nacheinander in KCl-Lösungen verschiedener Konzentration gebracht und die EMK festgestellt.

Kette:

Hg | HgCl $^{m}/_{1}$-KCl | Guajacol | KCl (variable Konzentration | m-KCl HgCl | Hg.

Tabelle II.
Reines Guajacol.

Konzentration der variablen KCl-Lösung	EMK Volt
$^{m}/_{1}$	+ 0,002
$^{m}/_{1000}$	+ 0,044
$^{m}/_{100}$	+ 0,027
$^{m}/_{10}$	+ 0,006
m	+ 0,001

Das Guajacol zeigt also schon einen Konzentrationseinfluß in demselben Sinne wie die lebenden Organe. Dasselbe ist also auch für Kationen reversibel. Der Konzentrationseinfluß ist aber erheblich kleiner als der beim Apfel gefundene. Dagegen zeigt das reine Guajacol nicht den Säureeinfluß, der für den Apfel charakteristisch ist, nämlich, daß, wenn wir mit wässeriger

Säurelösung und Salzlösung ableiten, die Säure ein kleineres Potential ergibt.

Beispiel. Reines Guajacol.

$^m/_{10}$-KCl . . . . — 0,001 Volt
$^m/_{10}$-HCl . . . . + 0,012 „

Es besteht also hier ein kleiner Effekt im entgegengesetzten Sinne, wie beim Apfel oder dem Blatt der Gummipflanze.

Wir stellten nun eine 10%ige Lösung des Merckschen käuflichen Lecithins in Guajacol her. Die Kette war dieselbe wie bei den Versuchen mit reinem Guajacol, nur daß 10% Lecithin im Gemisch gelöst war.

Tabelle III.

10% Lecithin, gelöst in Guajacol.

Konzentration der Lösung	EMK Volt	Differenz Volt
$^m/_1$-KCl	+ 0,012	
		> 0,029
$^m/_{10}$-KCl	0,041	
		> 0,050
$^m/_{100}$-KCl	0,091	
		> 0,046
$^m/_{1000}$-KCl	0,137	
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,042	
		> 0,042
$^m/_{10}$-HCl	± 0,000	
$^m/_{1250}$-HCl	+ 0,091	
		> 0,039
$^m/_{250}$-HCl	+ 0,052	
		> 0,037
$^m/_{50}$-HCl	+ 0,015	
		> 0,021
$^m/_{10}$-HCl	— 0,006	

Diese Werte sind nun in fast allen Stücken identisch mit den Werten, die wir beim Apfel oder dem Blatt von Ficus elasticus unter den gleichen Bedingungen erhielten. Einer 10fachen Verdünnung von KCl entspricht eine Zunahme der EMK um ungefähr 0,050 Volt. Beim Apfel war sie in demselben Falle und in demselben Konzentrationsbereich 0,051 Volt. Zweitens finden wir auch hier, daß mit zunehmender Konzentration der Salzlösung die EMK einem maximalen Wert zustrebt. Endlich finden wir, daß auch hier bei Ableitung mit wässeriger Säurelösung und Salzlösung gleicher Konzentration die Säure eine kleinere EMK gibt; und zwar ist der Unterschied ebenfalls von der Größenordnung des Verletzungsstromes, wie beim Apfel. Wir können also die bioelektrischen Potentialdifferenzen beim Apfel mit einer Mischung

von Lecithin in Guajacol qualitativ und quantitativ nachahmen.

Wir untersuchten nun das Verhalten einer 10%igen Lecithinlösung in m-Kresol, um uns zu überzeugen, daß die gefundene Übereinstimmung nicht nur für ein einziges Lösungsmittel gilt. Gleichzeitig wollten wir uns noch überzeugen, ob diese Lösung in bezug auf jedes Kation reversibel ist. Um zu zeigen, daß der gefundene Konzentrationseinfluß gleich demjenigen ist, den wir am lebenden Blatt der Gummipflanze gefunden haben, stellen wir die Resultate nebeneinander.

Tabelle IV.

Salzlösung	10% Lecithin in m-Kresol		Blatt der Gummipflanze	
	EMK Volt	Differenz Volt	EMK Volt	Differenz Volt
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,050			
$^m/_{6250}$-KCl	+ 0,150			
$^m/_{1250}$-KCl	+ 0,141		0,099	
$^m/_{250}$-KCl	+ 0,118	> 0,023	0,068	> 0,031
$^m/_{50}$-KCl	+ 0,084	> 0,034	0,036	> 0,032
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,049	> 0,035	0,012	> 0,024
m-KCl	+ 0,018	> 0,031		
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,043			
$^m/_{10}$-NaCl	+ 0,064			
$^m/_{1250}$-NaCl	+ 0,150		0,141	
$^m/_{250}$-NaCl	+ 0,128	> 0,022	0,103	> 0,038
$^m/_{50}$-NaCl	+ 0,098	> 0,030	0,067	> 0,036
$^m/_{10}$-NaCl	+ 0,061	> 0,037	0,043	> 0,024
$^m/_{2}$-NaCl	+ 0,030	> 0,031		
$^m/_{10}$-KCl	0,051			
$^m/_{10}$-$CaCl_2$	0,066			
$^m/_{1250}$-$CaCl_2$	0,126		0,116	
$^m/_{250}$-$CaCl_2$	0,101	> 0,025	0,085	> 0,031
$^m/_{50}$-$CaCl_2$	0,083	> 0,018	0,065	> 0,020
$^m/_{10}$-$CaCl_2$	0,065	> 0,018	0,053	> 0,012
$^m/_{2}$-$CaCl_2$	0,045	> 0,020		
$^m/_{10}$-KCl	0,042			
$^m/_{2}$-Na_2SO_4	0,030			
$^m/_{250}$-Na_2SO_4	0,122			
$^m/_{50}$-Na_2SO_4	0,090	> 0,032		
$^m/_{10}$-Na_2SO_4	0,055	> 0,035		
$^m/_{2}$-Na_2SO_4	0,030	> 0,025		

Die Analogie im Verhalten des in m-Kresol gelösten Lecithins und des Blattes der Gummipflanze ist schlagend. Es zeigt sich auch, daß das in Kresol gelöste Lecithin in bezug

auf jedes beliebige Kation reversibel ist. Hiervon muß die elektromotorische Wirkung des reinen m-Kresols abgezogen werden. Dieselbe ist aber noch geringer als die des reinen Guajacols, so daß die hier geschilderten Wirkungen fast ausschließlich dem Lecithin zuzuschreiben sind.

4. Versuche mit Kephalin. Herr Dr. P. A. Levene war so freundlich, uns etwas chemisch reines Kephalin zu überlassen. Dasselbe ist relativ wenig löslich in Guajacol, und wir arbeiteten deshalb mit einer gesättigten Lösung in Guajacol.

Tabelle V.

Kephalin in Guajacol.

Salzlösung	EMK Volt	Differenz Volt
m-KCl	± 0,000	
$^{m}/_{10}$-KCl	+ 0,038	
$^{m}/_{1250}$-KCl	+ 0,141	
$^{m}/_{250}$-KCl	+ 0,116	> 0,025
$^{m}/_{50}$-KCl	+ 0,075	> 0,041
$^{m}/_{10}$-KCl	+ 0,040	> 0,035
$^{m}/_{10}$-NaCl	+ 0,066	
$^{m}/_{1250}$-NaCl	+ 0,178	
$^{m}/_{250}$-NaCl	+ 0,135	> 0,043
$^{m}/_{50}$-NaCl	+ 0,096	> 0,039
$^{m}/_{10}$-NaCl	+ 0,060	> 0,036
$^{m}/_{2}$-NaCl	+ 0,027	> 0,033
5 $^{m}/_{2}$-NaCl	± 0,000	> 0,027
$^{m}/_{2}$-NaCl	+ 0,026	
$^{m}/_{10}$-NaCl	+ 0,065	

Das Kephalin weicht aber in zwei Punkten vom Lecithin ab. Erstens fehlt die negativierende Wirkung der Säuren, und zweitens ist die Calciumwirkung irreversibel.

Salzlösung	EMK Volt	
$^{m}/_{10}$-$CaCl_2$	+ 0,073	
$^{m}/_{1250}$-$CaCl_2$	+ 0,129	
$^{m}/_{250}$-$CaCl_2$	+ 0,116	
$^{m}/_{50}$-$CaCl_2$	+ 0,074	
$^{m}/_{10}$-$CaCl_2$	+ 0,034	
$^{m}/_{10}$-KCl	+ 0,027	
$^{m}/_{10}$-HCl	+ 0,052	

Im übrigen aber verhält sich Kephalin wie Lecithin.

5. Da wasserunlösliche Säuren, wie Beutner[1]) gefunden hat, die Eigenschaft besitzen, für Kationen reversibel zu sein, so lag es nahe, die wasserunlöslichen Fettsäuren, wie Ölsäure,

[1]) Beutner, Zeitschr. f. Elektrochemie 19, 1913.

Stearinsäure, Palmitinsäure u. a., die in den Phosphatiden durch Zersetzung vorkommen, auf ihr elektromotorisches Verhalten zu untersuchen. Es wäre ja denkbar, daß das Verhalten des Lecithins durch seinen Gehalt an wasserunlöslicher Fettsäure bestimmt sei. Es stellte sich heraus, daß diese Säuren sich in der Tat wie Lecithin verhalten.

Tabelle VI.

10 Vol.-% Ölsäure in Guajacol.

Salzlösung	EMK Volt	Differenz Volt
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,031	
$^m/_{1250}$-KCl	+ 0,124	> 0,030
$^m/_{250}$-KCl	+ 0,094	> 0,032
$^m/_{50}$-KCl	+ 0,062	> 0,028
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,034	> 0,028
$^m/_2$-KCl	+ 0,006	> 0,006
5 $^m/_2$-KCl	± 0,000	
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,031	
$^m/_{10}$-$CaCl_2$	+ 0,080	
$^m/_{1250}$-$CaCl_2$	+ 0,136	> 0,026
$^m/_{250}$-$CaCl_2$	+ 0,110	> 0,015
$^m/_{50}$-$CaCl_2$	+ 0,095	> 0,016
$^m/_{10}$-$CaCl_2$	+ 0,079	
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,031	
$^m/_{10}$-HCl	+ 0,028	

Die Ölsäure verhält sich also wie das Lecithin und die lebenden Pflanzenorgane; eine Ausnahme bildet nur ihr Verhalten den Säuren gegenüber, wenigstens in gewissen Lösungsmitteln. Die bei Lecithin und den lebenden Organen beobachtete Erniedrigung des Potentials fehlt hier.

Tabelle VII.

Salzlösung	EMK Volt	Differenz Volt
Palmitinsäure in Guajacol.		
$^1/_1$-KCl	+ 0,022	
$^1/_{1000}$-KCl	+ 0,072	> 0,022
$^1/_{100}$-KCl	+ 0,050	> 0,023
$^1/_{10}$-KCl	+ 0,027	> 0,005
$^1/_1$-KCl	+ 0,022	

Tabelle VII (Fortsetzung).

Salzlösung.	EMK Volt	Differenz Volt
Palmitinsäure in Guajacol.		
$^1/_1$-NaCl	+ 0,028	
$^1/_{1000}$-NaCl	+ 0,095	
$^1/_{100}$-NaCl	+ 0,067	> 0,026
$^1/_{10}$-NaCl	+ 0,038	> 0,029
$^1/_1$-NaCl	+ 0,023	> 0,015
$^1/_{10}$-HCl	+ 0,026	
$^1/_{100}$-HCl	− 0,018	> 0,044
$^1/_{1000}$-HCl	− 0,028	> 0,010
Stearinsäure in Guajacol.		
$^1/_1$-KCl	+ 0,016	
$^1/_{100}$-KCl	+ 0,039	
$^1/_{1000}$-KCl	+ 0,070	
$^1/_1$-KCl	+ 0,009	

Wir untersuchten sodann das Verhalten von Ölsäure in anderen Lösungsmitteln und fanden in Orthokresol eine starke Säurewirkung in demselben Sinne, wie wir dieselbe auch bei lebenden Organen beobachtet haben.

Tabelle VIII.

Säurelösung	EMK Volt	Differenz Volt
10% Ölsäure in o-Kresol.		
$^1/_1$-KCl	− 0,001	
$^1/_{10}$-KCl	+ 0,010	
$^1/_{1250}$-KCl	+ 0,065	
$^1/_{250}$-KCl	+ 0,054	> 0,011
$^1/_{50}$-KCl	+ 0,032	> 0,022
$^1/_{10}$-KCl	+ 0,014	> 0,018
$^1/_2$-KCl	− 0,001	> 0,013
$^1/_{10}$-KCl	+ 0,008	
$^1/_{10}$-HCl	− 0,071	
Reines o-Kresol.		
$^1/_{10}$-KCl	− 0,006	schwankend!
$^1/_{1000}$-KCl	+ 0,001	
$^m/_{10}$-HCl	− 0,024	
20% Ölsäure in Amylalkohol.		
$^1/_1$-KCl	− 0,002	
$^1/_{1000}$-KCl	+ 0,057	
$^1/_{100}$-KCl	+ 0,036	
$^1/_{10}$-KCl	+ 0,006	
$^1/_1$-KCl	± 0,000	

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Säurelösung	EMK Volt	Differenz Volt
Reiner Amylalkohol.		
$^1/_1$-KCl	− 0,002	
$^1/_{1000}$-KCl	− 0,013	
$^1/_{100}$-KCl	− 0,012	
$^1/_{10}$-KCl	− 0,008	
$^1/_1$-KCl	− 0,004	

6. Da man sich gewöhnlich vorstellt, daß Lecithin und Cholesterin in der Oberfläche der Zellen auftreten, so untersuchten wir auch das elektromotorische Verhalten von Cholesterin, das in Metakresol gelöst wurde.

Tabelle IX.
10 % Cholesterin in Metakresol.

Salzlösung	EMK Volt
$^m/_1$-KCl	+ 0,014
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,017
$^m/_{100}$-KCl	+ 0,042
$^m/_{1000}$-KCl	+ 0,042
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,019

Versuche mit Metakresol allein gaben fast dasselbe Verhalten. Cholesterin hat also keinen Einfluß auf das elektromotorische Verhalten.

7. Die nächste Frage war die, ob Fette ebenso wirken wie Phosphatide und wasserunlösliche Fettsäuren. Wir benutzten eine Lösung von 10 Vol.-% Triolein in Guajacol.

Tabelle X.
10 % Triolein in Guajacol.

Salzlösung	EMK Volt
$^m/_{10}$-KCl	0,016
$^m/_{1250}$-KCl	0,102
$^m/_{250}$-KCl	0,074
$^m/_{50}$-KCl	0,045
$^m/_{10}$-KCl	0,020

Die Säurewirkung fehlt hier ebenso wie bei der freien Ölsäure.

8. Schließlich machten wir noch Versuche mit Extrakten von Organen in Guajacol, um zu sehen, ob solche Extrakte dasselbe elektromotorische Verhalten zeigen wie die intakten Organe selbst. Apfelschalen wurden erst mit Wasser extrahiert, dann getrocknet und die trockenen Schalen 2 Tage lang mit Guajacol extrahiert. Der Guajacolextrakt wurde dann auf sein elektromotorisches Verhalten geprüft.

Tabelle XI.

Apfelschalenextrakt in Guajacol.

Salzlösung	EMK Volt	Differenz Volt
m-KCl	+ 0,001	
$^m/_{250}$-KCl	+ 0,057	
$^m/_{1250}$-KCl	+ 0,081	
$^m/_{250}$-KCl	+ 0,058	> 0,023
$^m/_{50}$-KCl	+ 0,030	> 0,028
$^m/_{10}$-KCl	+ 0,005	> 0,025
m-KCl	± 0,000	> 0,005

In bezug auf den Konzentrationseinfluß benimmt sich also der Extrakt der Apfelschale in Guajacol ähnlich wie der Apfel selbst. Der Säureeffekt besteht dagegen nicht.

$^m/_{10}$-KCl . . . + 0,005 Volt,
$^m/_{10}$-HCl . . . + 0,008 „

Es wurde dann ein ähnlicher Versuch mit dem Extrakt von Apfelfruchtfleisch in Guajacol gemacht.

Tabelle XII.

Apfelfruchtfleischextrakt in Guajacol.

Salzlösung	EMK Volt	Differenz Volt
$^1/_1$-KCl	− 0,006	
$^1/_{10}$-KCl	± 0,000	
$^1/_{1250}$-KCl	+ 0,088	
$^1/_{250}$-KCl	+ 0,056	> 0,032
$^1/_{50}$-KCl	+ 0,019	> 0,037
$^1/_{10}$-KCl	± 0,000	> 0,019
$^1/_2$-KCl	− 0,006	> 0,006

Hier ist die Annäherung noch besser, vermutlich weil die Extraktion vollständiger war als bei der Rinde des Apfels.

9. Unsere Versuche haben also ergeben, daß sich mit Lösungen von Phosphatiden (Lecithin und Kephalin) in verschiedenen Lösungsmitteln (Guajacol, Metakresol) das elektrische Verhalten der unverletzten Oberfläche lebender pflanzlicher Organe wie des Blattes des Gummibaumes, des Apfels u. a. in allen Einzelheiten nachahmen läßt.

Es lag nahe, daran zu denken, daß die wasserunlöslichen Fettsäuren wie Ölsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, hierfür verantwortlich seien. Es zeigte sich aber, daß das nicht ganz zutrifft, indem die bei lebenden Organen so charakteristische Säurewirkung, die auch bei den Phosphatiden beobachtet wird, bei den Fettsäuren in unseren Versuchen nicht in denselben Lösungsmitteln beobachtet wurde. Cholesterin scheint bei dem Zustandekommen der bioelektrischen Potentialdifferenzen nicht beteiligt zu sein.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Es wird gezeigt, daß die bioelektrischen Potentialdifferenzen, die die Verfasser an der Oberfläche unversehrter pflanzlicher Organe beobachtet und früher beschrieben haben, qualitativ und quantitativ nahezu identisch an der Grenze einer Lösung von Phosphatiden (in Guajacol, Metakresol, Amylalkohol) und einer wässerigen Lösung auftreten.

2. Es wird gezeigt, daß ein Extrakt des Apfels in Guajacol sich elektromotorisch genau so benimmt, wie lebende Organe.

3. Dem Guajacol und m-Kresol kommt das hier erwähnte Verhalten teils überhaupt nicht, teils in quantitativ geringem Maße zu, so daß die in 1. und 2. erwähnte Übereinstimmung den Phosphatiden resp. Extraktivstoffen und nicht dem Lösungsmittel zuzuschreiben ist.

4. Die wasserunlöslichen Fettsäuren (Ölsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure) zeigen den an lebenden pflanzlichen Organen gefundenen Konzentrationseffekt wässeriger Lösungen, dagegen nicht den Säureeffekt. Das gleiche gilt für Triolein. Man kann also das elektromotorische Verhalten der Phosphatide nicht völlig dem Gehalt an Fettsäuren zuschreiben.

5. Cholesterin zeigt kein elektromotorisches Verhalten, das dem lebenden Organe vergleichbar wäre.

6. Feste Eiweißkörper (geronnenes Hühnerei und feste Gelatine) zeigen nicht den Konzentrationseinfluß wässeriger Salzlösungen, der nach unseren früheren Arbeiten für die bioelektrischen Potentialdifferenzen charakteristisch ist.

7. Wir dürfen nach alle dem wohl schließen, daß die bioelektrischen Potentialdifferenzen dadurch bestimmt sind, daß gewisse lebende pflanzliche Organe an ihrer Oberfläche eine Schicht von Lecithin oder sonstigen Phosphatiden oder ähnlich wirkenden wasserunlöslichen Stoffen besitzen. Variationen in der Natur dieser Stoffe und ihrer Lösungsmittel sind wohl für die quantitativen Verschiedenheiten im elektromotorischen Verhalten verschiedener Organe verantwortlich.

Einfluß der Anaesthetica auf die Potentialdifferenz an der Oberfläche pflanzlicher und tierischer Gewebe.

Von

Jacques Loeb und Reinhard Beutner.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

(Eingegangen am 25. April 1913.)

1. In einer früheren Abhandlung[1]) haben wir gezeigt, daß die Potentialdifferenz an der unversehrten Oberfläche pflanzlicher Organe und wässeriger Salzlösungen scharf definierte und reversible Änderungen mit der Konzentration der Salzlösung aufweist. Der Sinn der Änderung ist derartig, daß von einer Reversibilität für Kationen gesprochen werden kann, die Größenordnung entspricht nahezu der nach der Nernstschen Formel berechneten. Ein qualitativ ähnliches Verhalten wurde mit verletzten Oberflächen pflanzlicher Organe sowie auch mit tierischen Organen beobachtet.

Wir haben ferner gezeigt, daß Nicht-Elektrolyte, wie Zucker und Harnstoff, keinen Einfluß auf die Potentialdifferenz haben, womit erwiesen ist, daß die von uns beobachteten Erscheinungen nicht durch osmotische Vorgänge hervorgerufen werden. Ganz anders dagegen verhalten sich die Anaesthetica.

2. Einfluß verschiedener Anaesthetica bei konstanter Salzkonzentration. Die Methodik dieser Versuche war ganz die gleiche wie die unserer früheren[2]). Als Versuchsobjekt diente ein Blatt der Gummipflanze oder ein Apfel; derselbe wurde in eine Schale gelegt, in der sich die Lösung mit dem betreffenden Anaestheticum befand. Eine kleine Menge $^{n}/_{10}$-KCl-Lösung ohne Zusatz von Anaestheticum wurde auf die obere Seite des unverletzten Apfels aufgebracht und von der-

[1]) Diese Zeitschr. **41**, 1, 1912; **44**, 303, 1912.

[2]) Loeb und Beutner, diese Zeitschr. **41**, 1, 1912.

selben mit einer $^1/_{10}$-KCl—HgCl-Elektrode zum Meßinstrument abgeleitet, die andere ableitende Elektrode (gleicher Art) tauchte in die untere Lösung der Schale. Bei allen Versuchen war eine geringe NaCl-Menge der Lösung in der Schale zugesetzt (meist $^n/_{1000}$-NaCl), denn sonst wäre die Potentialdifferenz in unkontrollierbarer Weise durch die geringsten Salzspuren, die in destilliertem Wasser zugegen sind, beeinflußt worden.

Die tatsächlich gemessene Kette war also:

Kalomel- Elektrode	Apfel	$^n/_{1000}$-NaCl-Lösung mit Zusatz der Anaesthetica	Kalomel- Elektrode.

Für die Narkose ist die Reversibilität entscheidend. Das folgende Beispiel zeigt, bis zu welchem Grade der Einfluß des Anaestheticumzusatzes reversibel ist. Äthylalkohol wurde als Anaestheticum verwendet.

Tabelle I.

Zeit Minuten	Vol.-% absoluter Alkohol in Lösung	EMK Volt
0	0,0	0,119
3	0,0	0,119
6	0,0	0,118
7	2,5	0,114
10	2,5	0,116
19	2,5	0,117
20	5,0	0,117
28	5,0	0,117
30	0,0	0,116
32	10,0	0,110
38	10,0	0,112
46	10,0	0,112
47	20,0	0,099
51	20,0	0,099
52	0,0	0,114
55	40,0	0,081
61	40,0	0,083
70	40,0	0,083
71	0,0	0,116
73	0,0	0,116
74	80,0	0,028
79	80,0	0,030
94	80,0	0,034
95	0,0	0,117
116	0,0	0,120

Diese Zahlen zeigen, daß erst bei dem hohen Alkoholzusatz von $^1/_{10}$ des Gesamtvolumens ein deutlicher bleibender Einfluß auf die Potentialdifferenz[1]) vorhanden ist. Diese Konzentration ist höher als die sonst zur Narkose verwendeten. Da aber selbst die Wirkung von 80 Vol.-$^0/_0$ Alkohol noch reversible Wirkung zeigt, so müssen wir annehmen, daß der Alkohol nur in Spuren in die Rinde des Apfels eindringt. Der Versuch zeigt, daß Alkohol ganz anders wirkt wie Zucker, der ja die Potentialdifferenz ganz unbeeinflußt ließ.

3. Weiterhin wurde die Wirkung gleicher Mengen verschiedener Alkohole auf die Potentialdifferenz verglichen. Zu diesen Versuchen konnten nur die 5 Alkohole: Methylalkohol, Äthylalkohol, n-Propylalkohol, Isobutylalkohol und Isoamylalkohol benutzt werden, da alle anderen Alkohole nur begrenzt mischbar mit Wasser sind. Selbst mit Amylalkohol ist die Sättigungskonzentration in Wasser so klein, daß der Einfluß auf die Potentialdifferenz gering ist.

Eine Anzahl von Messungen wurde zunächst mit gleichen Volumprozenten der betreffenden Alkohole ausgeführt. Die hier mitgeteilten Zahlen sind Mittelwerte von Messungen in Intervallen von 3 bis 5 Minuten. Die Reversibilität der Beobachtungen ist in allen Fällen dieselbe wie bei den Äthylalkohol-Wasser-Gemischen.

Tabelle II.

CH_3OH			C_2H_5OH			C_3H_7OH		
Vol.-%	EMK	Differenz	Vol.-%	EMK	Differenz	Vol.-%	EMK	Differenz
0	0,107		0	0,118		0	0,121	
5	0,110		5	0,117		5	0,122	
0	0,110	> 0,007	0	0,116	> 0,004	10	0,112	> 0,010
10	0,103		10	0,112		0	0,122	
20	0,097	> 0,013	20	0,099	> 0,015	20	0,104	> 0,018
0	0,110		0	0,114		0	0,122	> 0,058
40	0,087	> 0,024	40	0,083	> 0,033	40	0,064	
0	0,111		0	0,116		0	0,121	
80	0,053	> 0,059	80	0,034	> 0,083			
0	0,112		0	0,117				

[1]) Daß in erster Linie die Potentialdifferenz an der Schale des Apfels durch den Alkoholzusatz beeinflußt wird, erscheint wahrscheinlich. Die „Diffusionspotentialdifferenz" zwischen der Elektrode und der Lösung kann kaum so weitgehend beeinflußt werden.

C_4H_9OH		$C_5H_{11}OH$	
0 % . . .	0,103 Volt	0 % . . .	0,123 Volt
5 % . . .	0,093 „	1½ % . .	0,114 „

(Diese Werte liegen den Sättigungskonzentrationen nahe.)

Vergleichende Messungen mit äquimolekularen Mengen von Methyl-, Äthyl- und Propylalkohol ergaben folgendes Resultat. Die untersuchte Kette war in diesem Falle:

— $^1/_{10}$-Kalomel-Elektrode | Apfel | $^1/_{1000}$ n-KCl-Lösung + Anaestheticum | $^1/_{10}$-Kalomel-Elektrode +

Tabelle III.
Erniedrigung der EMK der Kette (in Millivolt).

	Konzentration		
	2,5 n	5,0 n	10,0 n
Zusatz von Methylalkohol . . .	5 M.V.	7 bis 8 M.V.	28 M.V.
„ „ Äthylalkohol . . .	8 bis 11 M.V.	18 bis 22 M.V.	37 M.V.
„ „ Propylalkohol . . .	12 M.V.	32 M.V.	104 M.V.

Naturgemäß zeigt sich bei Vergleichung äquimolekularer Lösungen der Einfluß des Molekulargewichts noch stärker wie bei Vergleichung gleicher Volumprozente. Diese Versuche zeigen ferner, daß eine einfache theoretische Beziehung zwischen Äquivalentkonzentration und Änderung der Potentialdifferenz, wie sie für Salzlösungen nachgewiesen werden konnte, hier nicht besteht. Es zeigt sich aber durchaus der negativierende Einfluß des Zusatzes des Anaestheticums.

Es ist auch von Interesse, daß die Wirksamkeit der Alkohole mit der Zahl der Kohlenstoffatome steigt, aber nicht parallel der Narkosewirkung.

4. Versuche mit anderen Anaesthica gaben ähnliche Resultate. Bei Ätherzusatz war ein deutlicher Einfluß erst nahe der Sättigungskonzentration von 10 Vol.-% zu konstatieren. Die Reversibilität war dann jedoch unvollkommen, wie die folgenden Zahlen zeigen. Gemessen ohne Ätherzusatz

($^1/_{10}$-KCl | Apfel | $^1/_{1000}$-KCl)

128 M.V., darauf 10 % Vol.-Äther der $^1/_{1000}$-KCl zugefügt nach 2 Minuten 101 M.V., nach 7 Minuten 93 M.V., darauf ätherfreie $^1/_{1000}$-KCl-Lösung appliziert und wieder gemessen; EMK steigt in 6 Minuten auf 110 M.V. und ist bei diesem Wert noch nach ca. $^3/_4$ Stunden konstant.

Als nichtflüchtiges Anaestheticum wurde Chloralhydrat untersucht. Der Einfluß auf die Potentialdifferenz erwies sich als sehr gering. Ein Zusatz von 20% Chloral brachte eine Änderung der Potentialdifferenz von nur 5 M.V. (in 22 Minuten) hervor, ein sehr großer Zusatz von 60%, eine solche von 20 M.V. Diese Tatsachen weisen alle darauf hin, daß die Narkotica nur sehr wenig löslich in der Apfelrinde sind.

5. Weitere Versuche betreffen die Frage, ob ein Zusatz von Alkohol in konstanter Konzentration die Veränderlichkeit der Potentialdifferenz mit dem Wechsel der Salzkonzentration beeinflußt. Wie die folgenden Versuche zeigen, besteht ein solcher Einfluß jedoch in nur sehr geringem Grade, die Veränderung der Potentialdifferenz mit der Konzentration der Salzlösung ist kleiner bei Alkoholzusatz. Dies gilt jedoch nur bei Gegenwart des Alkohols in der Lösung. Wiederholt man nachträglich mit alkoholfreier Lösung die Prüfung der Konzentrationsabhängigkeit, so stellen sich in völlig reversibler Weise die ursprünglich beobachteten größeren Werte wieder ein.

Ohne Alkoholzusatz:

Lösung		Differenz
$^1/_{10}$-KCl	10 M.V.	
$^1/_{1000}$-KCl	114 „	
		> 51 M.V.
$^1/_{100}$-KCl	63 „	
		> 53 „
$^1/_{10}$-KCl	10 „	

Mit Zusatz von 20 Vol.-% Äthylalkohol:

Lösung		Differenz
$^1/_{10}$-KCl	2 M.V.	
$^1/_{1000}$-KCl	93 „	
		> 47 M.V.
$^1/_{100}$-KCl	46 „	
		> 44 „
$^1/_{10}$-KCl	2 „	

Mit Zusatz von 50 Vol.-% Äthylalkohol:

Lösung		Differenz
$^1/_{1000}$-KCl	64 M.V.	
		> 33 M.V.
$^1/_{100}$-KCl	31 „	
		> 33 „
$^1/_{10}$-KCl	−2 „	

6. Frühere Versuche hatten gezeigt[1]), daß bei tierischen Objekten der Einfluß der Konzentration der Salze auf die Potentialdifferenz nur gering ist; weitere Versuche am Gastrocnemius des Frosches bestätigen diese Erfahrung; ein Ansteigen der EMK bei Verdünnung war zwar zu bemerken, dasselbe war jedoch durch die Schwankungen der beobachteten Werte fast verdeckt.

---

[1]) l. c., S. 19.

Den Einfluß der Anaesthetica beim Muskel zeigt folgender Versuch. Bei Ableitung von Sehne und entgegengesetztem Ende zeigte ein Gastrocnemius die EMK von 6 M.V., wobei letzteres Ende positiv. Bei Zusatz von 10 Vol.-$^0/_0$ Alkohol sank diese EMK auf 3 M.V., mit 20 Vol.-$^0/_0$ auf — 7 M.V.

Die Wirkung ist also im selben Sinn wie beim Apfel, jedoch etwas geringer.

7. Versuche mit Lecithin. Wir haben in der voraufgehenden Arbeit gezeigt, daß Lecithin, in Guajacol gelöst, dasselbe elektromotorische Verhalten zeigt wie die Oberfläche lebender Organe. Es war daher von Interesse zu untersuchen, ob Zusatz von Alkohol zur wässerigen Lösung die Potentialdifferenz an der Grenze von wässeriger Lösung und der Lecithin-Guajacollösung ebenfalls herabsetzt. Es zeigt sich, daß das der Fall ist. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in der voraufgehenden Arbeit.

	10 Gewichtsprozent Lecithin in Guajacol
$^m/_{20}$-KCl	+ 0,054 Volt
$^m/_{20}$-KCl + $^m/_4$-Traubenzucker	+ 0,050 „
$^m/_{20}$-KCl	+ 0,052 „
$^m/_{20}$-KCl in 5 $^0/_0$ Alkohol . .	+ 0,044 „
$^m/_{20}$-KCl „ 10 $^0/_0$ „ . .	+ 0,034 „
$^m/_{20}$-KCl „ 20 $^0/_0$ „ . .	+ 0,018 „
$^m/_{20}$-KCl „ 50 $^0/_0$ „ . .	— 0,001 „

Wir stellten dann noch einen ähnlichen Versuch mit Ölsäure in Guajacol gelöst an. Das Resultat war ebenfalls positiv.

	10 Vol.-$^0/_0$ Ölsäure in Guajacol
$^m/_{20}$-KCl	+ 0,043 Volt
$^m/_{20}$-KCl in 5 Vol.-$^0/_0$ Alkohol	+ 0,030 „
$^m/_{20}$-KCl „ 10 „ „	+ 0,021 „
$^m/_{20}$-KCl „ 20 „ „	+ 0,009 „
$^m/_{20}$-KCl	+ 0,041 „
$^m/_{20}$-KCl in 50 Vol.-$^0/_0$ Alkohol	— 0,002 „
$^m/_{20}$-KCl „ $^m/_4$-Traubenzucker	+ 0,043 „
$^m/_{20}$-KCl	+ 0,045 „

Wir haben uns auch überzeugt, daß selbst 2 m-Lösungen von Traubenzucker die Potentialdifferenz nicht beeinflussen.

Wir sehen also, daß der Zusatz von Alkohol die Potentialdifferenz an der Grenze von Lecithin oder Ölsäure, in Guajacol gelöst, ebenso herabsetzt, wie an der Grenze von Apfel und wässeriger Lösung. Es war ferner nötig, die Veränderung der Potentialdifferenz an reinem Guajacol bei Alkoholzusatz zu prüfen.

	Reines Guajacol.
$^{m}/_{20}$-KCl	+ 0,018 Volt
$^{m}/_{20}$-KI + 50 % Alkohol .	+ 0,014 „

Die Messung zeigt, daß der Einfluß sehr klein ist; wir sehen also, daß es nur der Gehalt an Ölsäure und Lecithin im Guajacol ist, der die oben beschriebene Wirkung hat.

Theoretische Bemerkungen.

Da Lecithin, Ölsäure, sowie die im lebenden Organ elektromotorisch wirksamen Substanzen wasserunlöslich, aber löslich in Alkohol und Äther sind, so muß die Erklärung für die Herabsetzung der Potentialdifferenz bei Zusatz von Alkohol oder Äther zur wässerigen Phase darauf führen, daß Äther in die wasserunlösliche Phase geht[1]).

Zusammenfassung der Resultate.

1. Es wird gezeigt, daß Zusatz von Alkohol oder Äther zur wässerigen Phase die Potentialdifferenz an der Grenze von lebenden Organen und wässerigen Lösungen herabsetzt. Diese Herabsetzung ist reversibel.
2. Die Mengen von Alkohol und Äther, die diese Wirkung herbeiführen, sind viel größer als die zur Narkose erforderlichen.
3. Der Zusatz von Äther oder Alkohol zur wässerigen Phase setzt die Potentialdifferenz an der Grenze von Lecithin oder Ölsäure, in Guajacol gelöst, ebenfalls herab.
4. Die Wirkung wird darauf zurückgeführt, daß infolge des Ätherzusatzes etwas Äther in die wasserunlösliche Phase eintritt.
5. Diese Wirkung wird nicht bei Zusatz von indifferenten Nichtleitern, wie etwa Traubenzucker, beobachtet.

---

[1]) Es sei noch bemerkt, daß, wie Beutner gefunden hat, allgemein der Zusatz von Alkohol die Potentialdifferenz an der Phasengrenze wässeriger Lösungen und wasserunmischbarer saurer Stoffe ebenso beeinflußt, wie bei den hier aufgeführten Versuchen. (Zeitschr. f. Elektrochem. **19**, 1913.)

Über den „Salzfehler" bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers[1].

Von

S. P. L. Sörensen und S. Palitzsch.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 6. Mai 1913.)

Mit 3 Figuren im Text.

In einer früheren Arbeit[2] haben wir den bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers vorhandenen, von dem großen Salzgehalt der zu messenden Lösung herrührenden Fehler, den sogenannten „Salzfehler", eingehend erörtert. Es stellte sich heraus, daß die Größe der wegen des Salzfehlers notwendigen Korrektion sowohl von der Art der verwendeten Vergleichslösungen wie auch von dem benutzten Indicator und außerdem natürlicherweise von dem Salzgehalt des Meerwassers abhängig war.

Wir hatten damals nur Gelegenheit, Meerwasser mit einem Salzgehalt von ca. 35 $^0/_{00}$ bzw. ca. 20 $^0/_{00}$ zu untersuchen, während Proben mit niedrigerem Salzgehalt nicht zu unserer Verfügung standen. Es ist uns deshalb eine Freude gewesen, einer Aufforderung des Herrn Professor Dr. R. Witting, Helsingfors, Folge zu leisten, auch eine Reihe von den „Hydrografisk-Biologiska Hafsundersökningarna, Helsingfors" aus dem nördlichen Teil der Ostsee entnommenen salzarmen Proben in unsere Untersuchungen mit hineinzuziehen, um dadurch unsere früher gewonnenen Resultate zu ergänzen. Der Salzgehalt

---

[1] Wird gleichzeitig in französischer Sprache in den „Compt. rend. des trav. du lab. de Carlsberg" **10**, Heft 2 veröffentlicht.

[2] Diese Zeitschr. **24**, 387, 1910.

dieser Proben, für deren Überlassung wir Herrn Professor Witting unsern besten Dank abstatten, variiert zwischen ca. 0,2 und 10,5 $^0/_{00}$, so daß wir jetzt nach der Untersuchung dieser teilweise sehr salzarmen Proben über Messungsresultate verfügen, die zur Erläuterung der Abhängigkeit zwischen Salzgehalt und „Salzfehlerkorrektion“ bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration in Meerwasserproben mit irgend einem Salzgehalt dienen können. Wir haben — wie aus dem Folgenden hervorgehen wird — diese Abhängigkeit graphisch ausgedrückt, indem wir als Abszisse den Salzgehalt in pro Mille und als Ordinate die Salzfehlerkorrektion benutzt haben. Diese letztere gibt die Größe an, die dem bei der colorimetrischen Messung gefundenen Wasserstoffionenexponenten p_H hinzugefügt werden muß, um den wahren Wasserstoffionenexponenten der Probe zu geben. Mittels dieser Kurven kann man somit bei Meerwasserproben mit bekanntem Salzgehalt diejenige Korrektion direkt ablesen, die in jedem speziellen Falle zu benutzen ist.

Die Korrektion kann positiv, Null oder negativ sein, und die Größe sowie auch das Vorzeichen derselben hängen von dem benutzten Indicator und von der Art der verwendeten Vergleichslösungen ab, so daß jede Kurve sich nur auf einen Indicator und eine Art Vergleichslösung bezieht. Durch die im Laufe der letzten Jahre ausgeführten Wasserstoffionenkonzentrationsmessungen von Meerwasserproben aus den verschiedensten Orten[1]) hat es sich indessen gezeigt, daß das Gebiet, innerhalb dessen die Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers variiert, ziemlich eng ist, so daß eine jede Meerwasserprobe mittels einer der folgenden vier Kombinationen colorimetrisch gemessen werden kann:

1. Boratmischungen und Phenolphthalein,
2. Boratmischungen und Naphtholphthalein,
3. Phosphatmischungen und Naphtholphthalein,
4. Phosphatmischungen und Neutralrot.

Die Korrektionskurven betreffs der drei erstgenannten Kombinationen sind auf den Tafeln I bis III wiedergegeben.

---

[1]) Kurt Buch, Föredrag vid Finska kemist-samfundets möte den 9. XI. 1910. — S. Palitzsch, diese Zeitschr. 37, 121, 1911.

In bezug auf die vierte Kombination (Phosphatmischungen und Neutralrot) haben wir früher für 35‰-Meerwasser eine Korrektion von + 0,10 und für 20‰-Meerwasser eine Korrektion von nur + 0,05 gefunden, während die jetzt untersuchten salzärmeren Meerwasserproben Korrektionen gegeben haben, die — bald positiv, bald negativ — unregelmäßig um Null variieren. Da wir nun außerdem bei diesen letzterwähnten Bestimmungen — wie es später erörtert werden wird (siehe S. 311) — mit besonderen Schwierigkeiten zu kämpfen gehabt haben, dürfen wir in diesem Falle keine Korrektionskurve zeichnen; andererseits glauben wir aber aussprechen zu dürfen, daß man bei colorimetrischer Messung mittels Phosphatmischungen und Neutralrot von salzarmen Meerwasserproben (10‰ und noch weniger) ohne wesentliche Fehler die Salzfehlerkorrektion gleich Null setzen darf.

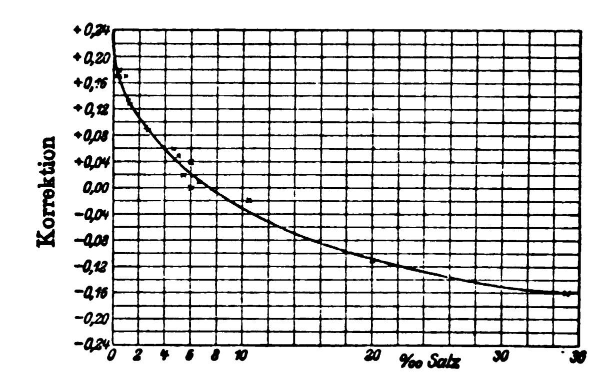
Experimenteller Teil.

Das bei der Bestimmung der Größe der Salzfehlerkorrektion befolgte Verfahren haben wir schon in unserer früheren Abhandlung[1]) ausführlich beschrieben und können uns deshalb hier damit begnügen, die Hauptzüge desselben wiederzugeben.

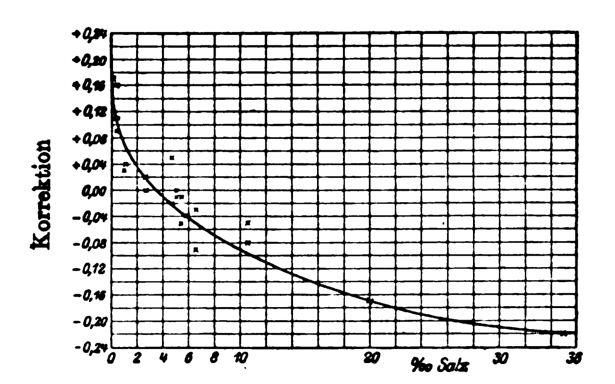
Eine Probe Meerwasser von bekanntem Salzgehalt wurde mittels 0,2 n-Salzsäure schwach, aber deutlich sauer gemacht, wonach die Kohlensäure mittels Durchleitung von Wasserstoff ausgetrieben wurde. Nachdem die Flüssigkeit durch kohlensäurefreie Natriumhydroxydlösung ganz oder zum Teil neutralisiert und die Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz einer kleinen Menge eines passenden Puffergemisches (Phosphat- oder Boratmischungen) nach Wunsch festgelegt worden war, wurde die so behandelte Wasserprobe aufs genaueste sowohl elektrometrisch wie auch colorimetrisch gemessen. Die Differenz zwischen dem elektrometrisch und dem colorimetrisch gefundenen Wert des $p_{H^{\cdot}}$ gibt dann den gesuchten Salzfehler an, indem wir hier ebenso wie bei unseren früheren Versuchen den Einfluß unberücksichtigt gelassen haben, den die Vorbehandlung der Flüssigkeit auf die Größe der Salzfehlerkorrektion ausüben kann.

---

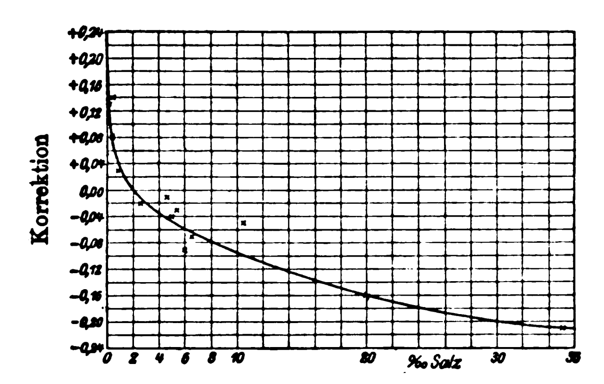
[1]) Diese Zeitschr. 24, 390, 1910.



Tafel I: Boratmischungen und Phenolphthalein.



Tafel II: Boratmischungen und Naphtholphthalein.



Tafel III: Phosphatmischungen und Naphtholphthalein.

Auf den Tafeln I bis III sind die Versuchsresultate für die folgenden drei Kombinationen:

Tafel I: Boratmischungen und Phenolphthalein,
" II: Boratmischungen und Naphtholphthalein,
" III: Phosphatmischungen und Naphtholphthalein

wiedergegeben, indem der Salzgehalt der Meerwasserprobe als Abszisse und die Salzfehlerkorrektion — mit Vorzeichen gerechnet — als Ordinate benutzt sind. Jedes kleine Kreuz bezeichnet einen Versuch. Schließlich wurden die Korrektionskurven unter möglichst gleichmäßiger Berücksichtigung aller Versuchsresultate und unter Benutzung der in unserer früheren Arbeit gefundenen Werte der Salzfehlerkorrektionen, 35 $^0/_{00}$ bzw. 20 $^0/_{00}$ Salz entsprechend, gezeichnet.

Bei der Betrachtung der Tafeln I bis III ersieht man gleich, daß von einer genauen Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Versuchsresultaten nicht die Rede ist. Dieses kann indessen der Natur der Sache wegen auch nicht erwartet werden, indem — wie wir zu wiederholten Malen hervorgehoben haben[1]) — die colorimetrische Messung — selbst unter den günstigsten Umständen — mit einem Fehler von bis zu $\pm$ 0,05 in dem Werte des $p_{H^{\cdot}}$ behaftet sein kann. Eine genaue Durchsicht der Tafeln zeigt nun, daß nur eine Bestimmung eine Korrektion gegeben hat, die von dem aus der Tafel abgelesenen Wert 0,07 differiert (Borat-Naphtholphthaleintafel; Salzkonzentration 4,65 $^0/_{00}$). Bei allen übrigen 43 Bestimmungen ist die Abweichung höchstens 0,05, ja bei 34 dieser Bestimmungen ist die Abweichung nur 0,03 oder noch kleiner.

Wir haben also bei den hier erwähnten drei Kombinationen eine ähnliche, wenn auch nicht eine ebenso große Genauigkeit erlangt wie bei unseren früheren Versuchen. Diese haben wir dagegen bei den Messungen mit der Kombination: Phosphatmischungen-Neutralrot nicht erreichen können. Wir haben in diesem Falle, wie schon erwähnt (S. 309), Korrektionen gefunden, die unregelmäßig zwischen + 0,05 und — 0,07 variieren. Die Ursache hiervon glauben wir darin suchen zu müssen, daß die zur Untersuchung vorliegenden Wasserproben bisweilen einen schwach gelblichen Farbenton aufgewiesen haben, wodurch be-

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 221, 1909 und **24**, 390, 1910.

sonders die colorimetrische Messung mittels Neutralrot unscharf wurde, weil dieser Indicator in dem Wasserstoffionengebiet, von dem hier die Rede ist, eben eine rötlichgelbe Farbennuance zeigt. Wir glauben jedoch aus unseren Messungen den Schluß ziehen zu dürfen, daß die Salzfehlerkorrektion bei der colorimetrischen Messung von salzarmem Meerwasser mittels Phosphatmischungen und Neutralrot so geringfügig ist, daß dieselbe ohne wesentliche Fehler vernachlässigt werden kann.

Seit unserer früheren Mitteilung über die Salzfehlerkorrektion hat K. A. Hasselbalch[1]) ein auch zur Messung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten brauchbares Verfahren, die sogenannte „Schüttelmethode" ausgearbeitet, die vielfach Anwendung gefunden und besonders bei der Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration des Blutes ausgezeichnete Dienste geleistet hat. Es wäre also sehr naheliegend gewesen, diese Methode bei den hier erwähnten Untersuchungen zu verwenden. Es zeigte sich indessen bald, daß Meerwasserproben sowie auch andere salzhaltige und pufferarme Lösungen nach dem ursprünglichen Hasselbalchschen Verfahren nicht hinreichend genau gemessen werden konnten, indem es so gut wie niemals möglich war, ein wirklich konstantes Potential zu erhalten. Es ist weder Dr. Hasselbalch, mit dem wir zur Lösung dieser Frage zusammen gearbeitet haben, noch uns geglückt, eine Erklärung der hier erwähnten oft sehr launenhaften Verhältnisse ausfindig zu machen, wahrscheinlich muß aber die Ursache derselben in dem sehr geringfügigen Puffergehalt der betreffenden Flüssigkeiten gesucht werden.

Obgleich also die Ursache dieser Unregelmäßigkeiten noch immer unaufgeklärt bleibt, ist es doch möglich, wie Dr. Hasselbalch gezeigt hat, auch in pufferarmen, kohlensäurehaltigen Flüssigkeiten die Messung genau auszuführen, wenn nur die ursprüngliche Methodik etwas abgeändert wird. Die wichtigsten dieser Änderungen, über deren Einzelheiten Dr. Hasselbalch selbst kürzlich berichtet hat[2]), sind die beiden folgenden: Erstens wird das Elektrodengefäß — mit Hilfe eines kleinen

[1]) Diese Zeitschr. 30, 317, 1910.
[2]) Diese Zeitschr. 49, 451, 1913.

Elektromotors — ununterbrochen, auch während der Messung, gedreht, und zweitens ist die benutzte Platinelektrode auf ihrer ganzen Oberfläche platiniert und derart in dem Elektrodengefäß angebracht, daß dieselbe in ihrem ganzen Umfange während des Schüttelns von der Flüssigkeit bespült wird.

Wir haben mittels dieses modifizierten Hasselbalchschen Verfahrens eine Reihe Messungen teils in den obenerwähnten finnländischen, teils in salzreicheren Meerwasserproben ausgeführt und gleichzeitig die Wasserstoffionenkonzentration colorimetrisch bestimmt. Die hierdurch gewonnenen Werte der Größe der Salzfehlerkorrektion zeigen — was die salzreichen Proben betrifft — eine gute Übereinstimmung sowohl unter sich wie mit unseren früheren Bestimmungen. So haben 11 Versuche mit 6 verschiedenen Wasserproben mit ca. $35\,^0/_{00}$ Salz für die Kombination: Phosphatmischungen-Naphtholphthalein eine durchschnittliche Salzfehlerkorrektion von — 0,17 ergeben (bei einem Versuch wurde — 0,24 gefunden, bei den übrigen variierte die gefundene Korrektion zwischen — 0,14 und — 0,20); die für diese Kombination von uns früher bestimmte Korrektion hat den Wert — 0,16. In betreff der finnländischen Proben war die Übereinstimmung weniger gut, und zwar wahrscheinlich aus dem Grunde, daß sowohl die Hasselbalchsche wie auch die entsprechende colorimetrische Messung direkt in der pufferarmen Meerwasserprobe ausgeführt wird, deren Wasserstoffionenkonzentration sich außerordentlich leicht ändern kann. Diese Fehlerquelle wird dagegen bei dem in unseren Hauptversuchen verwendeten Verfahren vermieden, indem die Wasserstoffionenkonzentration vor den Messungen durch Zusatz von ein wenig Puffermischung festgelegt wird.

Über den Einfluß der Ernährung auf die Ausscheidung von Indol und Indican bei gesunden Menschen.

Von

W. v. Moraczewski und E. Herzfeld.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Universitäts-Klinik in Zürich.)

(Eingegangen am 9. Mai 1913.)

In den Theorien über die Abstammung des Harnindicans ist noch immer wenig Sicheres zu finden. Wenn man auch nach den Untersuchungen der früheren Forscher[1]) annehmen darf, daß die Quelle des Indicans das aus der Darmfäulnis stammende Indol ist, so wissen wir über die Ursachen einer vermehrten oder verminderten Indicanausscheidung wenig Sicheres.

Wir wollen ganz von der Theorie absehen, die das Indoxyl als Stoffwechselprodukt, als Zerfallsprodukt der Gewebe ansieht, und wollen nur das Indol der Fäulnis in Rechnung ziehen.

Nehmen wir also als sicher an, daß alles Indoxyl dieser Quelle entstamme, so müssen wir noch zwei Möglichkeiten betrachten: 1. Das Indol wird ohne Störung resorbiert und ausgeschieden. 2. Das Indol wird zum Teil verbrannt, vor oder nach der Resorption.

---

[1]) Die zahlreiche Literatur ist mit den Namen von Jaffé, Ellinger, Scholz, Gonter usw. als Repräsentanten einer Richtung, mit den Namen Ferd. Blumenfeld, F. Rosenthal, C. Levin — als Repräsentanten der anderen — sowie mit den Namen von L'Abbe und Vitry, Hervieux, Maillard, Gilbert verbunden. Die Literatur ist zum Teil in Baars Buche „Über Indicanurie", Wien 1912, zum Teil, und viel vollständiger, in der Abhandlung von Maillard, Dictionaire de Physiologie par Charles Richer, Tome IX, Fascicule premier. Paris. Alcan. zu finden.

Was nun die erste Möglichkeit anbetrifft, so ist es nicht ohne weiteres klar, warum die gleiche Menge Eiweiß verschiedene Mengen Indoxyl liefert. Wir können uns darüber zweierlei Vorstellungen machen:

1. Es kann alles Eiweiß zersetzt und im Dünndarm resorbiert werden. Dann ist kein fäulnisfähiges Material vorhanden und der Dickdarm kann kein Indol produzieren, trotz der Anwesenheit der Bakterien als Fäulniserreger. Diese Zustände herrschen sowohl im Hunger, bei mangelhafter Eiweißernährung, wie bei ausgezeichneter Resorption[1]). Worauf diese letzteren beruhen sollen, ist uns nicht klar. Wir können sie aber messen, indem wir die Menge des nicht resorbierten Stickstoffs im Kote bestimmen, indem wir weiter die Chloride des Kotes bestimmen und die Menge der Faeces überhaupt berücksichtigen. Es wäre zu ermitteln, ob es Faktoren gibt, die die Resorption im Darme befördern, und ob eine gewisse Verdünnung der Massen, die bei vegetabilischer Nahrung eintreten könnte, die Resorption günstig beeinflußt[2]). Weiter wäre zu ermitteln, ob eine gründliche Zersetzung der Nahrung ebenso wirken könnte, ob eine energische Pankreasverdauung, eine energische Darmsafttätigkeit — vielleicht durch Vegetabilien angeregt, durch Fett gelähmt — die Resorption des Darminhaltes vollkommen macht. Dieses alles sind Umstände, die in Frage kommen, wenn wir bei mäßigem Stickstoffgehalte der Nahrung wenig Indoxyl auffinden.

2. Haben wir bei mäßiger Stickstoffmenge viel Indoxyl im Harne, so müssen wir uns von dem eben Genannten gerade das Gegenteil vorstellen. Also muß viel fäulnisfertiges Material im Darme vorliegen, und dieser Überschuß müßte sich ausdrücken in einer großen Kotmenge, die viel Stickstoff und viel Chloride enthält. Hier könnte die mangelhafte Verdauung an der schlechten Ausnutzung Schuld tragen, entweder hat die Pankreassekretion das Eiweiß nicht genügend

---

[1]) Brandeis (Compt. rend. Soc. Biol. 67) findet große Mengen Indican bei „Residualeiweiß“, z. B. Residualeiweiß 0,02, Indican 0,060; Residualeiweiß 0,008, Indican 0,010. Die Bestimmungsmethoden sind nicht angegeben.

[2]) Die Vegetabilien verhindern nach unseren Untersuchungen die Eiweißspaltung.

gespalten, oder ein Zusatz von Fett[1]) zur Nahrung die Aufsaugung verhindert.

Es muß hier gleich betont werden, daß alles dieses im Tone einer Vermutung ausgesprochen ist. Weiter müssen wir ausdrücklich hervorheben, daß man hier nicht schematisieren darf und daß man sehr viel Parenthesen einschieben muß. So ist z. B. die Wirkung des Pankreas gewiß geeignet, die Aufsaugung des Eiweißes zu steigern, indem es die Spaltung des Eiweißmoleküls bedingt. Liegt aber die Pankreasfunktion brach, so ist damit nicht gesagt, daß das Indoxyl im Harne gesteigert erscheint. Es werden dann zwar die Eiweißkörper vielleicht unresorbiert in den Dickdarm gelangen, aber eine mangelhafte Pankreassekretion wird zur Folge haben, daß die Bakterien das unzersetzte Eiweiß schwerer angreifen nnd daraus weniger Indol bilden, als wenn bei richtiger Pankreasverdauung die Eiweißzersetzungsprodukte, besonders das Tryptophan, in den Dickdarm gelangen würden. Diese beiden Faktoren können sich also gegenseitig aufheben.

Wir haben den größeren oder geringeren Gehalt an Indoxyl im Harne bis jetzt nur aus dem Gesichtspunkte der Aufsaugungsfähigkeit betrachtet und stillschweigend vorausgesetzt, daß das im Dickdarme vorliegende Eiweiß oder Tryptophan sicher der Fäulnis anheimfällt. Wir müssen jetzt noch die Frage diskutieren, 1. warum die Fäulnis nicht immer gleichmäßig stattfindet, 2. warum sie nicht die gleichen Indolmengen liefert.

1. Vor allem muß man hier die Mengen des Tryptophans ausscheiden. Je reicher an Tryptophangruppen die Eiweißnahrung, je mehr fertiges und nicht resorbiertes Tryptophan, je besser die Zersetzung des im Dünndarme nicht resorbierten Eiweißes, um so effektiver die Fäulnis, um so mehr Indol und Indican wird gefunden.

2. Bei mangelhafter Eiweißspaltung, wie bei Pankreasinsuffizienz, kann wenig Indol und Indican auftreten, wenn gleichviel unresorbiertes Eiweiß im Dickdarm vorliegt. Aber auch bei gut vorbereiteten Spaltungsprodukten werden wir keine Indolentwick-

[1]) Wir sagen „Fett“ auf Grund unserer Erfahrung, daß Fettzusatz im allgemeinen die Indoxylmenge steigert. Ebenso könnten aber der Zucker oder die Kohlenhydrate, überhaupt jeder Überschuß der Nahrung, wirken.

lung und dann auch kein Indoxyl treffen, wenn die Fäulnis durch Gärung gestört wird. Diese Gärung kann bei Überschuß von Kohlenhydraten und Zucker auftreten und durch Entwicklung von Säure und Alkohol die Fäulnis hemmen. Die oft gemachte Beobachtung, daß Zusatz von Kohlenhydraten[1]) das Indoxyl des Harns vermindere, beruht wohl auf dieser Voraussetzung. Auch hat Hirschler in der Zeitschr. f. physiol. Chem., Band X, die Beobachtung beschrieben, daß bei Kohlenhydratzusatz aus dem Eiweiß bei Fäulnis kein Indol entsteht. Dasselbe wurde von W. v. Moraczewski in den Versuchen bei künstlicher Verdauung vielfach beobachtet. Aber was in vitro geschieht, muß nicht immer in vivo geschehen, und man kann nicht ohne weiteres sagen, daß bei Kohlenhydraten und Zucker keine Indolbildung stattfindet. Hat man je eine Säureentwicklung im Darme beobachtet außer bei ganz schwerer Erkrankung? Hat man je Zucker in den Faeces nachgewiesen? Gewiß darf man eher voraussetzen, daß aller Zucker im Dünndarme aufgesaugt wird, man darf mit gutem Rechte sagen, daß es zu einer sauren Gärung im Dickdarme nicht kommt, und die Herabsetzung des Indoxyls im Harne mag vielleicht in anderen Prozessen ihren Grund haben.

Soviel über die Indol- und Indoxylmenge, die von der Darmfäulnis abhängen soll, vorausgesetzt, daß kein anderer Faktor in Frage käme.

Aber wir dürfen nicht vergessen, daß alle, die Indol per os gegeben haben, ob sie an Tieren oder Menschen experimentierten [Ed. Wang[2]), Max Kaufmann[3])], nie das ganze Indol im Harne wiedergefunden haben. Die Beobachtungen von W. v. Moraczewski[4]) zeigen, daß je nach der Nahrung das Indol mehr oder weniger gut verbrannt wird, daß es bald das Harnindoxyl steigert, bald spurlos verschwindet. Dieses will sagen, daß es bei gewissen Umständen denkbar wäre, eine geringe Indoxylmenge im Harne zu finden, trotz-

[1]) Krauß, Kohlenhydrate der Nahrung usw. (Zeitschr. f. physiol. Chem. 18) gibt an, daß in der Periode, wo neben Fleisch auch Brot verabreicht wurde, der Hund weniger Indican im Harne ausschied.

[2]) Ed. Wang, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 557.

[3]) Max Kaufmann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 168.

[4]) W. v. Moraczewski, Arch. della fisiologia Palermo 1911 (italienisch). — Centralbl. f. inn. Med. 1911.

dem die Indolmenge im Dickdarm hoch wäre; und umgekehrt: es wäre denkbar, daß eine geringe Indolentwicklung sich deutlich als Indoxyl dokumentiert, wenn der Organismus die Fähigkeit, das Indol zu verbrennen, verloren hat.

Wir hielten es für angezeigt, dieses alles vorauszuschicken, um damit anzudeuten, wie kompliziert die Frage der Indoxylbildung ist, und damit unsere Forschungen zu rechtfertigen.

Seitdem Jaffé das Indol im Harndestillate gefunden hat und seitdem wir dank der Methode von E. Herzfeld und K. Baur[1]) eine Bestimmung des Indols klinisch ausführen können, schien es uns angezeigt, die oben genannten Indolbildungsphasen mit einer Indolbestimmung im Harne zu verbinden, um zu sehen, ob uns die Indolmenge nicht Aufschluß über den Prozeß liefert.

Wir haben auf Grund früherer Erfahrung im Prinzip drei Arten von Ernährung unterschieden: 1. eine eiweißreiche Kost, 2. eine fettreiche Kost, 3. eine kohlenhydratreiche Kost.

Da man die Kohlenhydrate nicht gut ohne gleichzeitige Eiweißvermehrung geben kann, wenn man sie nicht als reinen Zucker gibt, so haben wir ausschließlich Milch und Rohrzucker verabreicht: Kuchen und alle Mehlsorten sind gleichfalls stickstoffhaltig, und der Zweck unserer Versuche war ja, dasselbe indolliefernde Material unter verschiedenen Bedingungen zur Verdauung und Fäulnis zu bringen.

Als weiteres Material haben wir in unseren Versuchen den Zusatz von Gelatine und eine Ernährung mit tryptophanarmer Kost (Maisgrütze) berücksichtigt.

Die Versuche wurden an drei gesunden Personen ausgeführt. Dr. K. hatte nur annähernd gleichmäßige Kost. Herr B. hatte Milch und Brot unter Zusatz von Butter oder Milchzucker genommen. Dr. M. hatte sowohl bei Milchdiät wie bei gemischter Kost Fett und Zucker superponiert. Außerdem wurde bei der gemischten Kost einmal bei Überernährung, das anderemal bei Unterernährung experimentiert.

Die Methoden waren die üblichen: Stickstoff im Kot und Harn nach Kjeldahl, Chloride im Kot und Harne nach Volhard, wobei der Kot mit chemisch reiner Soda getrocknet

[1]) E. Herzfeld und K. Baur, Centralbl. f. inn. Med. 34, Nr. 11, 1913.

und verkohlt wurde. Indol nach Herzfeld und Baur (l. c.), Indican nach Obermeyer.

Die Indicanbestimmung im Harne wurde insofern abgeändert, als man sich statt der Titration einer colorimetrischen Methode bedient.

Der Harn wurde mit 10 Teilen Bleizucker auf 100 Harn ausgefällt; dann wurden 55 ccm filtriert und mit 55 ccm einer 2 $^0/_0$ igen Eisenchloridsalzsäure versetzt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Das Chloroform wurde bis auf 50 ccm eingeengt und diese Lösung mit einer Stammlösung im Dubosque-Colorimeter verglichen.

Diese Methode liefert wohl höhere Werte, aber es will uns scheinen, daß sie gerade deshalb Beachtung verdient. Sowohl das Abdampfen wie das Waschen gibt bei den anderen Methoden Fehlerquellen genug, und je weniger man manipuliert um so sicherer sind die Ergebnisse. Zudem ist die Farbe gerade das, was sowohl über die Menge Aufschluß gibt, wie auch als Vergleich imponiert. Es ist also angezeigt, gerade die Farbe zu messen[1]).

Allerdings kann es vorkommen, daß man statt der blauen Farbe eine rote bekommt, die mit der Stammlösung nicht zu vergleichen ist. Dann muß man zu der Titrationsmethode seine Zuflucht nehmen.

Selbstverständlich kann man den zur colorimetrischen Bestimmung gebrauchten Chloroformauszug immer abdampfen und den Rückstand dann wie üblich titrieren.

Dies Verfahren wurde von uns in den Ausnahmefällen geübt. Das direkte Versetzen des Harnes mit Obermeyers Reagenz hat nur das Unangenehme, daß eine Emulsion entsteht, die man durch Alkohol und Wasser beseitigen muß. Sonst liefert diese Methodik fast die gleichen Werte, die man durch das Fällen mit Bleiessig erzielt. Das Ausfällen mit Bleizucker oder das abermalige Fällen mit Phosphorwolframsäure liefert geringere Zahlen. In zweifelhaften Fällen wird man die direkte Methode zur Kontrolle gebrauchen.

---

[1]) Durch besondere Versuche wurde festgestellt, daß das Ausfällen mit Bleizucker die höchsten Werte gibt, daß sowohl die Ausfällung mit Bleiacetat wie die direkte Oxydation des nicht entbleiten Harnes unbedeutend niedrigere Werte liefert. Zudem ist nicht entbleiter Harn wegen der Emulsion schwer auszuschütteln.

Neben der direkten Bestimmung des Kotindols durch Destillation haben wir eine zweite Indolbestimmung in dem abermals verdauten Destillationsrückstand gemacht.

Die Nachverdauung des Kotes hatte den Zweck, zu ermitteln, wieviel Eiweiß noch zurückgeblieben ist, wieviel indolliefernde Substanz unresorbiert war. Zu diesem Ende wurden die schon durch Destillation indolfreien Faeces mit Pankreatin, Fäulnisbakterien und etwas Soda versetzt und 24 Stunden im Thermostat gelassen. Nach dieser Zeit wurde abermals destilliert und das Indol im Destillate bestimmt. Die Indolbestimmungsmethode blieb für Harn und Faeces die gleiche. Da sie sehr empfindlich ist, so mußte bei den Faeces oft der Destillationsauszug verdünnt werden — besonders bei dem nach vegetabilischer Nahrung gewonnenen Kote, wo viel nicht aufgesaugtes Eiweiß vorlag.

Die Ergebnisse unserer Arbeit sind in den Tabellen zusammengestellt und ohne weiteres zu verstehen.

Es muß vor allem hervorgehoben werden, daß man sehr oft einen direkten[1]) Zusammenhang zwischen dem Indolgehalte der Faeces und dem Indoxyl des Harnes ersieht: So zeigt Zusatz von Fett eine Steigerung des Kotindols, eine solche von Zucker eine Herabsetzung der Indolmenge, und beides spiegelt sich im Harne wieder. Eine eiweißreiche Nahrung steigert beide Größen.

Demgegenüber muß um so mehr betont werden, daß es an Beobachtungen nicht fehlt, wo dieses einfache Verhältnis nicht stattfindet. So hatten wir bei Fettzusatz nach der Maisfütterung eine sehr deutliche und beträchtliche Steigerung, trotzdem die Indolmenge nicht vermehrt wurde. Wenn das Fett überhaupt die indolliefernden Körper vor der Resorption schützt[2]) und sie quasi rascher in den Dickdarm befördert, wo sie der Fäulnis unterliegen, so kann in diesem Falle bei indolfreiem Material — oder wenigstens bei indolarmem Material wie Mais und Vegetabilien — dieses nicht gut zutreffen. Es scheint uns eher hier die Verbrennung des Indols, z. B. in der

---

[1]) Das will sagen, daß oft viel Indican im Harne mit viel Indol im Kote zusammentrifft.

[2]) Die Nachgärung gibt bei Fettnahrung viel Indol, also schützt das Fett tatsächlich das Eiweiß vor der Fäulnis.

Leber, eine schlechtere zu sein. Der Organismus kann vielleicht durch Unterernährung die Fähigkeit verloren haben, das Indol zu verbrennen, und wenn man durch Fettzusatz die Oxydation noch weiter in Anspruch nimmt, dann kommt auch das wenige Indol in Form von Indican im Harne zur Ausscheidung.

Ebenso unvereinbar mit der Theorie einer einfachen Beziehung zwischen Kot- und Harnindol ist unsere Beobachtung, die wir bei Gelatinenahrung gemacht hatten. Hier wurde die Indoxylmenge deutlich herabgesetzt, ja das künstlich zugesetzte Indol wurde spurlos verbrannt. Es kann also diese Indoxylverminderung kaum auf einer besseren Aufsaugung im Dünndarm oder aber auf einer Fäulnisherabsetzung im Dickdarm beruhen[1]). Ein Zusatz von Gelatine ist der Resorption eher hinderlich, wie Zucker und Fett. Ein Überschuß von Gelatine kann wohl kaum die Fäulnis stören; darauf deuten auch die Chlor- und Stickstoffzahlen im Kote.

Somit bleibt nichts übrig als anzunehmen, daß die Gelatine durch Ernährung die Oxydationsfähigkeit des Organismus steigert, was auch unser Indolversuch beweist.

Darauf beruht wohl auch die Indoxylherabsetzung, die die anderen Autoren bei Gelatinezusatz beobachtet hatten[2]), denn es soll nochmals betont werden: in unserem Versuche blieb die Eiweißmenge, somit die indolliefernde Gruppe, die gleiche. So wurde nicht etwa das tryptophanreiche Eiweiß durch tryptophanarme Gelatine ersetzt, sondern es wurden außer der Stammkost 170 g Gelatine genommen.

Wir haben bei unseren Versuchen entgegen der üblichen Anschauung durch Zusatz von Zucker eine Steigerung des Indoxyls beobachtet. Man darf aber dennoch die Richtigkeit der früheren Beobachtung nicht bestreiten.

Die Steigerung war immer am ersten Tage deutlich und ist darauf zurückzuführen, daß durch die große Zuckermenge (200 g Milchzucker) Darmstörungen hervorgerufen waren. Auch dürfte dieser Zuckerzusatz die Aufsaugung des Eiweißes im Dünndarme hindern und somit reichlich fäulnisfähiges Material dem Dickdarme zuführen. Diese beiden Faktoren genügen

---

[1]) Sonst müßte in der Nachgärung viel Indol sein.

[2]) Frank P. Underhill, Amer. Journ. of Physiol. 12, 176.

wohl, um die Steigerung zu erklären. Dieselbe zeigt jedoch bald eine Tendenz zum Sinken. Was nun diese Herabsetzung angeht, so müssen wir betonen, daß wir sie nicht nur auf Fermentation im Dickdarm zurückführen[1]), sondern eher geneigt sind anzunehmen, daß hier bei Zuckernahrung das Blut und die Leber oxydationsfähiger werden („glykogenfähig" Georg Rosenfeld). Ebenso muß gesagt werden, daß der Fettzusatz nicht allein die Aufsaugung stört und fäulnisfähiges Material dem Darme zufügt, sonst müßte ja die Indicansteigerung am ersten Tage eintreten. Indessen beobachteten wir ein Steigen des Indoxyls mit der Zeit, was sich sehr wohl damit erklärt, daß der Organismus durch Fettzusatz die Oxydationsfähigkeit verliert. Das Fallen des Indoxyls bei Fettzusatz, das zuweilen beobachtet wurde, könnte eher auf der Nachwirkung der vorhergehenden Periode beruhen. Die Steigerung des Indoxyls durch Fett steht nicht vereinzelt da: Fett steigert Aceton, Ammoniak, Amidosäuren und Oxalsäure. So wurde ja diese bekannte Erscheinung auf die Acetonbildung aus buttersauren Salzen zurückgeführt. Unserer Meinung nach ist dieses der Ausdruck der verminderten Oxydationsfähigkeit, die bei früheren Versuchen von Dr. W. v. M. bereits betont wurde und die auch jetzt durch unsere Indoltoleranzbestimmung bestätigt wird.

Das Indol des Harnes wurde in unseren Versuchen besonders beobachtet, und wir trachteten aus den gewonnen Zahlen eine Abstammung dieses Körpers herzuleiten, oder ihn wenigstens in Beziehung zu anderen Harnbestandteilen zu bringen. Leider war dieses nicht gut möglich. Von einer Beziehung zwischen Kotindol und Harnindol ist kaum die Rede: so ist z. B. bei eiweißreicher Kost das Harnindol absolut geringer als bei Fettnahrung, was weder mit dem Kotindol noch mit dem Harnindican übereinstimmt. Wir beobachteten mit einer gewissen Ständigkeit ein Steigen bei Fett, ein Sinken bei Kohlenhydraten, und zwar setzte dieses Sinken und Steigen am ersten Tage ein, nicht etwa wie das Kotindol, das allmählich zu fallen oder zu steigen pflegt. Auch hatte die an Vegetabilien reiche

---

[1]) Es müßte sonst das nicht der Fäulnis anheimgefallene Eiweiß bei der Nachgärung Indol liefern.

Nahrung nicht den Einfluß, den sie auf das Kotindol ausübt. Dieses fällt regelmäßig bei Vegetabiliennahrung, dagegen zeigt das Harnindol deutlich eine Tendenz zum Steigen und erreicht dabei die höchsten Zahlen.

Wenn wir somit keine Beziehung zum Kotindol finden, so ist auch eine Beziehung zum Harnindoxyl kaum nachweisbar. Die Fette steigern zwar auch das Harnindoxyl, die Kohlenhydrate drücken die Menge des Indoxyls herunter, aber die Vegetabilien üben einen ganz verschiedenen Einfluß aus. Sie vermindern das Harnindoxyl und steigern die Indolmengen im Harne. Bei Eiweißkost ist es umgekehrt: dort wird die Indoxylmenge gesteigert, die Harnindolmenge herabgesetzt.

Es war sehr verlockend, eine Relation in dem Sinne zu finden, daß das Harnindol ein Antagonist des Harnindoxyls sei, und je mehr das Indoxyl an Menge zunimmt, um so weniger Indol im Harn zu finden. Dieses wäre auch leicht begreiflich, wenn das Indol des Harnes von dem aus dem Darme resorbierten Tryptophan abstammen würde. Dann wäre natürlich um so mehr Indol zu finden, je mehr Tryptophan im Dünndarm aufgesaugt wird, um so weniger blieb dann für die Fäulnis übrig. Und umgekehrt, je weniger Eiweiß im Dünndarm aufgesaugt wird, je weniger Indol im Harne, um so mehr Eiweiß verfällt der Darmfäulnis und liefert um so mehr Harnindoxyl. Leider erwies sich auch diese Hypothese als unrichtig, denn es gibt Fettkörper, die sowohl das Harnindol wie das Harnindoxyl steigern, und Körper, die beides herabsetzen, wie es die Zuckerarten tun. Nur für Vegetabilien und Eiweiß ist die reziproke Beziehung deutlich, sie kann aber auf anderen Ursachen beruhen.

Wenn wir uns an das Verhalten der Oxalsäure, des Ammoniaks, der Amidosäuren usw. erinnern, so finden wir bei dem Indol, oder richtiger gesagt bei dem Körper, der die Indolreaktion gibt, die gleichen Schwankungen, die alle „Schlacken“ beim Stoffwechsel zeigen. Und zwar ist die Verbrennung um so besser, je weniger Indol im Harne (Zuckernahrung), um so schlechter, je mehr Indol aufgefunden wird (Fettnahrung und Hunger bei Vegetabilien).

Eine Stütze für unsere Anschauung betreffs des Harnindols liefern die Beobachtungen, die Dr. Willy Kaufmann

im hiesigen Laboratorium an pathologischen Fällen machte. Es wurde das Harnindol mit dem Harnindican verglichen und dabei kein Parallelismus gefunden. Das Harnindol zeigte vielmehr dort eine Vermehrung, wo man einen schlackenreichen Harn erwarten durfte: bei perniciöser Anämie, Carcinoma usw. Demgegenüber zeigte bei überaus großen Indicanmengen, die man bei Peritonitis findet, das Harnindol normale Werte.

Wir müssen noch unseren Versuch erwähnen, den wir mit tryptophonarmer Kost angestellt haben. Bekanntlich soll Zein tryptophanfrei sein[1]) (Osborne); wir haben also während 4 Tagen ausschließlich Maismehl und Salat neben 1 l Tee genommen und darauf Kot und Harn nach den üblichen Methoden untersucht. Es hat sich eine Verminderung des Kotindols sowie des Harnindicans herausgestellt, die aber nicht die Grenze erreichte, die wir bei Gelatine oder bei gemischter Kost notiert haben. Es ist also entweder das Zein nicht ganz tryptophanfrei[2]), oder aber der Organismus wird bei dieser Kost eine geringe Toleranz für Indol besitzen. Daß dem so ist, beweist unser Versuch, bei dem wir neben dem Maismehl reichlich Fett genommen haben. Sofort stieg die Indicanmenge in die Höhe, und zwar betrug das Indican das Doppelte der am vorigen Tage notierten Menge. Betont sei noch, daß das Indol des Harnes und der Faeces hier keine Steigerung nach Fettzusatz zeigte.

Unsere Toleranzbestimmungen bestätigen nicht überall die Erfahrung, die Dr. M. früher gemacht hatte. Damals wurde von Dr. M. beobachtet, daß bei reichlicher Ernährung, besonders bei Zuckerzusatz, die Mengen von 0,02 g Indol keine Steigerung des Harnindicans bewirkte. Hier fanden wir eine Toleranz nur bei Gelatine und bei Vegetabilienzusatz. In den übrigen Fällen, z. B. bei normalen Menschen bei der gewöhn-

---

[1]) Osborne und Harris (Journ. of Amer. Chem. Soc. 25) finden das meiste Tryptophan in den Wallnüssen, das geringste im Mais. — Fasal (diese Zeitschr. 44) findet Edestin tryptophanarm, Milchalbumin besonders reich.

[2]) Die künstliche Verdauung des Zeins ergab mäßige Mengen Indol, viel mehr als Gelatine gibt. Auch ist der Tryptophangehalt ganz beträchtlich.

lichen Kost, fanden wir sowohl bei B. wie bei M. und K. keine Toleranz, wohl aber war die Toleranz groß, als B. Milch und Brot zu sich nahm; bei M. bei Milch und Vegetabilien und bei Milch und Gelatine[1]).

Man kann also nicht bestreiten, daß die von uns gegebene Menge spurlos verschwinden kann; dieses Verschwinden fehlt auch meistens bei einer Herabsetzung des Indicans, was bei den früheren Versuchen von Dr. W. M. nicht immer der Fall war[2]). Damals wurde z. B. bei Alkoholgenuß eine Verminderung der Toleranz bei Herabsetzung des Harnindicans gefunden. Eine Vermehrung der Toleranz wird bei Zucker gefunden, wobei allerdings eine Verminderung des Harnindicans zu beobachten war. Auch bei Fett konstatierte damals Dr. W. v. M. eine Steigerung des Indicans und konsequent damit eine Verminderung der Toleranz für Indol. Wenn wir also auch hier den Eindruck gewinnen, daß eine Erhöhung der Toleranz mit einer Verminderung des Harnindicans zusammenfällt, wenn wir umgekehrt einen Mangel an Toleranz mit einer Erhöhung des Indicans beobachten, so dürfen wir dennoch auch auf Ausnahmen gefaßt sein.

Wir haben der Kotanalyse besondere Aufmerksamkeit geschenkt, da wir uns wohl bewußt waren, daß hier der Schwerpunkt der Frage liege. Auch wurde in einer früheren Arbeit von Dr. W. v. M. betont, wie leicht hier Fehlschlüsse geschehen. Findet man z. B. viel Indol in den Faeces und wenig Indican in dem Harn, so könnte man nach Gonter[3]) geneigt sein zu schließen, daß alles Indol durch den Darm ausgeschieden und mithin nichts aufgesaugt wurde. Bei großen Indolmengen sollte man also kleine Indicanmengen erwarten. Dem ist aber durchaus nicht so, denn gerade das Umgekehrte findet meistens statt. Wenn Gonter durch Abführmittel eine Herabsetzung des Indicans erzielt, so müssen wir um so mehr betonen, daß bei uns die Wirkung des Zuckers mit der Abführung auch

[1]) Allerdings bewirkten 0,02 g Indol bei Zucker eine geringe Steigerung, bei Fett eine große Steigerung des Harnindicans, was mit dem über Fett Gesagten in Einklang steht.

[2]) Sulla relatione fra indolo degli feci e indicano delle orine. Palermo 1901. Arch. di fisiologia **9**.

[3]) Gonter, Arch. des maladies des enfants **11**, 592.

eine Steigerung des Indicans bewirkte. Und es ist klar warum. Die abführende Wirkung des Zuckers kann fäulnisfähiges Eiweiß und Tryptophan in den Dickdarm bringen und dadurch besonders die Bildung des Indols fördern.

Man sucht umsonst in den Arbeiten derjenigen Autoren, die die Darmfäulnis direkt mit der Indicanausscheidung verbinden, eine richtige Analyse der Fäulnis und Resorption. Nur bei Brandeis und bei Bertrand[1]) finden wir einen Versuch, das Residualeiweiß des Dickdarmes mit der Indicanmenge in Verbindung zu bringen, oder die Indicanmenge von der Gärung und der Reaktion des Dickdarminhaltes abhängig zu machen.

Wie schon am Anfang unserer Abhandlung gesagt worden ist, haben wir versucht, durch Bestimmung des Resteiweißes Aufschluß über die Resorption zu gewinnen.

Es wurde aus jeder Periode das Indol abdestilliert und mit Pancreatin und Kot zur neuen Indolgärung angesetzt. Nach 24 Stunden wurde daraus die gebildete Indolmenge quantitativ bestimmt.

Die Resultate dieser Bestimmungen sind in der Tabelle IV zusammengestellt. Es wurde darin das Gesamtindol von je 2 oder je 3 Versuchstagen bestimmt. Wenn man die gefundenen Zahlen betrachtet, so kann man sagen, daß die Vegetabilien und Fette die Resorption des Indols verhindern, und damit könnte wohl erklärt werden, warum bei vegetabilischer Nahrung die Indicanmenge heruntergeht[2]). Es wäre zu untersuchen, ob dieses die einzige Ursache ist, ob man durch Herabsetzung des Gasamteiweißes die gleiche Indicanmenge erzielen könnte wie bei Vegetabilienzusatz. Wenn nämlich die Vegetabilien nur eine schlechte Aufsaugung, also eine Verminderung des fäulnisfähigen Tryptophans bedeuten, so mußte eine absolute Verminderung des Tryptophans die gleichen Indicanmengen liefern. Indessen sehen wir bei gleichen Indolmengen im Darminhalt, also bei gleicher Tryptophanmenge, verschiedenen Indicangehalt des Harnes. So 1. bei Milch und Vegetabilien 10 mg Indolgehalt und 102 mg Indican; 2. bei Mais

[1]) Bertrand, Annales de l'Institut Pasteur 27 I, 78, 1913.

[2]) Merkwürdig ist, daß die Fettnahrung ganz anders wirkt, nämlich indicansteigernd.

und Vegetabilien 9 mg Indol und 69 mg Indican; 3. bei Eiweiß und Vegetabilien ohne Kohlenhydrate 9 mg Indol und 165 mg Indican. Dieses will unserer Meinung nach sagen, daß je mehr Kohlenhydrate auf die gleiche Eiweißmenge kommen, um so weniger Indican erscheint im Harne. Denn im letzten Falle haben wir am wenigsten Zucker in der Nahrung, dagegen bei Mais die größte Kohlenhydratmenge in der Nahrung gehabt.

In der Bestimmung des Restindols in den Faeces haben wir also ein sicheres Mittel, die Aufsaugung des Eiweißes im Darme zu messen. Diese Messung ergab, daß die Vegetabilien und Fette die Resorption am wirksamsten verhindern.

Ein Fettzusatz zur Nahrung hat also eine schlechte Aufsaugung des Indols zur Folge, denn überall bei Fett finden wir hohe Zahlen der Nachgärung. Wenn aber bei Vegetabilien das Kotindol um so geringer ausfällt, so bewirkt das Fett eine gleichzeitige Steigerung des Kotindols. Die Versuche, die Dr. W. v. M. bei künstlicher Verdauung der Eiweißkörper angestellt hatte, ergaben ebenfalls eine Steigerung des Indols, wenn bei der künstlichen Fäulnis Fett zu der faulenden Flüssigkeit zugesetzt wurde. Es scheint, daß das Fett das Indol aufzulösen vermag und es auf diese Weise vor der Verflüchtigung schützt. Wenn dem so wäre, wenn also Fett durch Absorption des Indols zu einer Anhäufung in den Faeces führen würde, so ist die Frage berechtigt, ob man deshalb nicht eine Verminderung des Indicans erwarten sollte. Betont sei noch, daß die Chloride der Faeces bei Fettnahrung die geringsten Werte zeigen, was für gute Absorption der anderen Bestandteile sprechen würde. Wir finden aber nicht nur keine Verminderung, sondern eine deutliche Steigerung der Indicanzahlen; besonders aus den gut beobachteten Versuchen von M. (Tabelle III). (Diese Steigerung wurde unter anderen von Jaffé[1]) bestritten.) Sowohl bei Milchdiät wie bei vegetabilischer Kost finden wir bei Fettzusatz eine Steigerung des Indicans. Bei Milch und bei gemischter Kost ist eine ebensolche Steigerung des Indols im Kote und auch in der Nachgärung bei Fettzusatz zu verzeichnen, und wenn man auf

---

[1]) Jaffé, Über Indicanurie. Deutsche Klinik 11, 199.

dem Standpunkt Ellingers und seiner Schule steht, so dürfte man ohne weiteres die Indicansteigerung durch die Vermehrung des Darmindols deuten. Wir betonen aber, daß diese Vermehrung im Kote nicht eine Steigerung der Indolbildung, sondern eine Retention von Indol bedeutet. Es ist auch gar nicht denkbar, aus einer bestimmten Menge Eiweiß mehr Indol zu gewinnen. Das Fett hindert nur die Resorption, bringt mehr Tryptophan zum Faulen, aber dennoch ist die Indicanmenge der mangelhaften Resorption entsprechend.

Vergleichen wir die höchsten Indolzahlen im Kote, so sehen wir, daß dieselben einmal durch Fett, das andere Mal durch Eiweißkost veranlaßt sind, und wir finden, daß die Eiweißnahrung eine größere Indicanmenge im Harne hervorruft als die ebenso indolreiche Fettnahrung.

So haben wir bei 38 mg Indol 219 mg Indican bei Fettnahrung, bei 29 mg Indol im Kot 260 mg Indican bei Eiweißnahrung. Zudem sehen wir bei Verlängerung der Eiweißkost ein Fallen des Kotindols bei einem relativ hohen Indicangehalt. Bei Fettnahrung steigt mit der Zeit beides, sowohl Kotindol wie Harnindican.

Dieses Verhalten scheint darauf zu deuten, daß bei Fettnahrung die Toleranz für Indol gering ist. Das Fett scheint überhaupt das Indol in den Faeces zurückzuhalten, das Fett löst das Indol in sich und hütet es vor der Aufsaugung — wir sollten also eine Verminderung des Harnindicans erwarten. Wenn wir aber regelmäßig eine Steigerung finden, so deutet das auf eine geringe Toleranz. Dieselbe Indolmenge, die bei Zucker und Eiweißnahrung glatt verbrennen würde, wird bei Fettnahrung nicht zerstört (s. die Toleranzbestimmung).

Die große Indicanmenge bei Eiweißkost findet ihre Erklärung in der großen Indolmenge der Faeces. Hier scheint beides in direktem Zusammenhange zu stehen. — Man kann sich denken, daß bei der hohen Stickstoffzahl des Harnes reichlich Eiweißspaltungsprodukte aufgesaugt worden sind und relativ wenige im Kot der Fäulnis verfallen. Im Verhältnis zum Stickstoff ist sowohl im Harne wie in den Faeces relativ wenig Indican und Indol. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch hier der Organismus das absorbierte Indol besser ver-

braucht und deshalb ein Zusatz von Überschuß an Eiweiß eine unverhältnismäßig geringe Indican- und Indolsteigerung verursacht.

Wir haben bereits gesagt, daß der Zuckerzusatz das Indican des Harnes auf die Dauer herabsetzt, wenn auch anfangs eine Steigerung zu verzeichnen war. Dieser Herabsetzung des Indicans entspricht eine Herabsetzung des Kotindols. Und auch hier wäre nichts einfacher, als anzunehmen, daß die geringe Indolmenge ihren Einfluß in der Herabsetzung des Indicans ausübt. Weshalb aber diese Herabsetzung des Indols im Kote? Bei Fett und Vegetabilien fanden wir in der Nachgärung die fehlende Indolmenge. Bei Zucker finden wir überhaupt wenig Indol. Wenn durch Gärung oder Säure, wie Bertrand[1]) meint, die Bakterien an der Indolbildung gestört sind, so müßte nach dem Abdestillieren und Versetzen mit neuen Bakterien das neu gebildete Indol entstehen. Denn bei Vegetabilien war diese Nachgärung indolreich gewesen. Wenn aber bei Zucker auch nach Entfernung der störenden Einflüsse kein Indol entsteht, so sind wir berechtigt anzunehmen, daß bei Zuckerzusatz eine bessere Aufsaugung des Indols oder des Tryptophans stattfindet, nicht eine geringere Bildung. Unsere Versuche zeigen, daß im Anfang durchaus nicht weniger Indol in den Faeces entsteht. Im Gegenteil, scheint die Zuckernahrung die Indolbildung zu begünstigen, als ob die Bakterien energischer arbeiten sollten — erst in den folgenden Tagen finden wir weniger Indol und dementsprechend weniger Indican.

Man darf wohl annehmen, daß sich unterdessen Bakterien entwickelt haben, die kein Indol bilden wollen, aber dann müßten wir das Indol in der Nachgärung finden. — Es muß somit der Verdacht entstehen, daß bei Zuckernahrung wohl Indol gebildet wird, daß es aber besser aufgesaugt wird und besser verbrennt. Auch das Verhalten der Chloride und des Stickstoffs deuten darauf, daß bei Zuckerdiät eine anders geartete Resorption stattfindet; nicht wie bei Fett, wo die Chloride fallen und der Stickstoff im Kote ansteigt[2]). Fett und Zucker

---

[1]) Bertrand, Annales de l'Inst. Pasteur 27, 1913. I, 78.

[2]) Beim Zucker sind die Chloride im Kot vermehrt.

üben also einen entgegengesetzten Einfluß. Fett hindert die Indolaufsaugung und deshalb finden wir viel Indol im Kote. Zucker befördert eher die Indolresorption, vielleicht auch Troyptophanresorption, deshalb die allmähliche Verminderung des Kotindols.

Wenn trotzdem bei Fettnahrung die Indicanmenge steigt und bei Zucker fällt, so glauben wir, dieses zum Teil auf eine bessere Toleranz bei Zucker, eine schlechtere bei Fett zurückführen zu müssen. — Daß die Fettnahrung ihren Einfluß auf die nachfolgenden Tage ausübt, erhellt aus den Tabellen. Bei den letzten Versuchen haben wir am dritten Tage der Fett- oder Zuckerkost analysiert, um den Einfluß deutlich zu machen. Die Zahlen für Indican haben wir an jedem Tage notiert, und wir geben sie hier wieder. Nach der gemischten Kost: Fett, 100 bis 200 g, ergab am 20. IV. 0,23 g, am 21. IV. 0,25 g Indican.

Zucker, 200 bis 250 g, ergab am 22. IV. 41 g Indican als Nachwirkung von Fett, darauf am 23. IV. 0,246 g, am 24. IV. 0,168 g, am 25. IV. 0,139 g Indican.

Wir haben nie bei Indolverabreichung eine Steigerung des Indols der Faeces zu verzeichnen. Was die Toleranz angeht, so haben wir bei M. eine Steigerung nach Indol beobachtet, und zwar war die Steigerung bei Fett am günstigsten und bei gemischter Kost dieselbe wie bei Zucker; bei Eiweiß größer als bei den vorhergehenden.

Bei Zuckernahrung zeigte M. eine kleinere Steigerung des Indicanwertes als bei Fett, was wohl auf der „Glykogenanhäufung" in der Leber beruht und als Regel gelten kann. Bei B. finden wir ebenfalls eine geringere Steigerung nach Zucker, eine größere nach Fett. Bei gemischter Kost zeigte M. das gleiche Resultat wie bei Milchkost, B. das gleiche wie bei Zuckerkost. Keine Steigerung ergab sich bei B. nach Milchkost, bei M. bei Vegetabilien und Gelatine.

Man kann wohl nicht annehmen, daß dieses Verschwinden des zugesetzten Indols ein Zufall sei. Wenn man die früheren Versuche Dr. W. v. M.s berücksichtigt, so bilden diese mit Ausnahme der Zuckerkost eine Bestätigung der damals gefundenen. Meistens steigern die Kohlenhydrate die Toleranz, die Fette und die Eiweißkörper vermindern sie. Dies gilt nicht nur vom

Indican, sondern auch von allen anderen Schlacken des Stoffwechsels. Sowohl Harnsäure wie Oxalsäure und Aceton werden bei kohlenhydratreicher Nahrung besser als bei Fettnahrung verbrannt.

Erwähnt sei noch, daß das *Indol im Harne* durch den Zusatz von Indol zur Nahrung nie beeinflußt war, ebenso wie wir es von dem Kotindol eben sagten.

Eine richtige *Bilanz des Indols* im Organismus ließ sich nicht aufstellen. Der eine von uns (Dr. M. v. W.) hat zwar durch besondere Versuche die Menge des Indols, das durch künstliche Verdauung gewonnen werden kann, festgesetzt und sie bei jedem Eiweiß nahezu konstant gefunden. Besonders das Casein wurde in dieser Richtung vielfach geprüft, und es wurden aus 1 g Casein konstant 0,003 g Indol gewonnen. — Da nun unsere Versuche hauptsächlich mit Milchnahrung ausgeführt wurden, so läßt sich leicht berechnen, wieviel Indol im ganzen entstehen kann. Ein Liter Milch gibt 6 g Stickstoff, also wenn 0,12 g Stickstoff 1 g Casein entsprechend 0,003 g Indol liefern, so werden wir aus 1 l Milch 0,15 g Indol erwarten. Da nun im Kote sehr wenig Indol auftritt, etwa 0,012 bis 0,020 g, und das Indican dem Gewichte des Moleküls nach fast dem Molekulargewichte des Indols entspricht[1]), so mußten wir etwa 0,3 Indican erwarten, falls alles Eiweißindol zur Resorption gelangen würde. Wir finden nach unseren Methoden, die recht hohe Zahlen liefern, kaum die Hälfte des erwarteteten Indols, und es ist wahrscheinlich, daß ein Teil des indolliefernden Tryptophans ohne zu faulen resorbiert wird. Da nun dieser Tryptophanverlust kaum zu schätzen ist, so ist auch die Bilanz nicht aufzustellen und die Menge des verbrannten Indols nicht zu messen.

Wir sind damit beschäftigt, bei Kranken ähnliche Versuche anzustellen und die Rolle des Stoffwechsels bei der Indicanausscheidung weiter zu beleuchten.

---

[1]) $C_6H_4\left\langle {CO \atop NH} \right\rangle C = C \left\langle {CO \atop NH} \right\rangle C_6H_4$ aus zwei C_8H_7N verhält sich dem Gewichte nach wie 262 (Indigo) zu 234 (2 Indole).

Tabelle I.

Fall K.

Harn									Faeces					
Harnmenge in 24 Std. ccm	Spez. Gew.	Reaktion	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	Indol in 100 ccm mg	Ges.-Indol mg	Indican in 100 ccm g	Gesamt-Indican g	Faecesmenge in 24 Std. g	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	Indol in verarb. Faec. mg	Gesamt-Indol mg	Nahrung
1020	1,028	sauer	$\alpha_1 = 48^0\ 42'$ $\alpha_2 = 38^0\ 12'$	$\varepsilon = 0{,}0320$	0,0499	0,509	0,0225	0,2295	—	—	—	—	—	Gem. Kost + reichl. Kohlenhydrate.
950	1,028	„	$\alpha_1 = 47^0\ 30'$ $\alpha_2 = 35^0\ 42'$	$\varepsilon = 0{,}0363$	0,0466	0,443	0,0460	0,4370	255	$\alpha_1 = 73^0\ 42'$ $\alpha_2 = 14^0\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}2278$	0,355	7,10	Gem. Kost + reichl. Kohlenhydrate.
900	1,030	„	$\alpha_1 = 48^0\ 18'$ $\alpha_2 = 33^0\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}0471$	0,0735	0,661	0,0630	0,5670	170	$\alpha_1 = 77^0\ 48'$ $\alpha_2 = 13^0\ 42'$	$\varepsilon = 0{,}2556$	0,399	16,00	Gem. Kost + reichl. Fett.
1200	1,024	„	$\alpha_1 = 54^0\ 30'$ $\alpha_2 = 40^0\ 00'$	$\varepsilon = 0{,}0446$	0,0696	0,835	0,0099	0,1188	—	—	—	—	—	Gem. Kost (wie gewöhnlich).
1270	1,022	„	$\alpha_1 = 48^0\ 30'$ $\alpha_2 = 36^0\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}0380$	0,0593	0,753	0,0230	0,2921	190	$\alpha_1 = 64^0\ 12'$ $\alpha_2 = 21^0\ 12'$	$\varepsilon = 0{,}1454$	0,227	9,08	Gem. Kost + reichl. Kohlenhydrate.
720	1,026	„	$\alpha_1 = 49^0\ 18'$ $\alpha_2 = 33^0\ 54'$	$\varepsilon = 0{,}0476$	0,0743	0,535	0,0322	0,2218	245	$\alpha_1 = 81^0\ 12'$ $\alpha_2 = 8^0\ 00'$	$\varepsilon = 0{,}3325$	0,519	20,76	Gem. Kost + reichl. Fett.
640	1,029	„	$\alpha_1 = 50^0\ 12'$ $\alpha_2 = 27^0\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}0740$	0,1450	0,928	0,0288	0,1513	145	$\alpha_1 = 63^0\ 06'$ $\alpha_2 = 17^0\ 00'$	$\varepsilon = 0{,}1619$	0,253	10,02	Gem. Kost + reichl. Fett.
950	1,029	„	$\alpha_1 = 50^0\ 12'$ $\alpha_2 = 41^0\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}0277$	0,0422	0,401	0,0368	0,3496	115	$\alpha_1 = 68^0\ 48'$ $\alpha_2 = 20^0\ 48'$	$\varepsilon = 0{,}1663$	0,259	10,30	Gem. Kost + reichl. Eiweiß.
1200	1,025	„	$\alpha_1 = 53^0\ 06'$ $\alpha_2 = 36^0\ 18'$	$\varepsilon = 0{,}0516$	0,0803	0,964	0,0230	0,2760	243	$\alpha_1 = 78^0\ 30'$ $\alpha_2 = 8^0\ 48'$	$\varepsilon = 0{,}3003$	0,468	18,70	Gem. Kost (Ascaris im Kote).
1250	1,024	„	$\alpha_1 = 47^0\ 12'$ $\alpha_2 = 35^0\ 12'$	$\varepsilon = 0{,}0370$	0,0577	0,711	0,0250	0,3125	100	$\alpha_1 = 56^0\ 30'$ $\alpha_2 = 27^0\ 18'$	$\varepsilon = 0{,}0933$	0,145	5,80	Gem. Kost + 20 mg Indol.
1840	1,018	„	$\alpha_1 = 52^0\ 36'$ $\alpha_2 = 37^0\ 30'$	$\varepsilon = 0{,}0463$	0,0722	1,330	0,0250	0,4600	142	$\alpha_1 = 73^0\ 42'$ $\alpha_2 = 17^0\ 30'$	$\varepsilon = 0{,}2070$	0,323	12,90	Gem. Kost + 40 mg Indol.

Tabelle II.
Fall B.

Harn: Harnmenge in 24 Std. ccm	Spez. Gew.	Reaktion	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	N in 100 ccm %	Gesamt-N g	Indol in 100 ccm mg	Gesamt-Indol mg	Indican in 100 ccm g	Gesamt-Indican g	Faeces: Faecesmenge in 24 Std. g	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	N %	Gesamt-N g	Indol in verarb. F. mg	Gesamt-Indol mg	Nahrung
1300	1,024	sauer	$\alpha_1 = 49^0\,30'$ $\alpha_2 = 32^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0539$	—	—	0,0841	1,100	0,0036	0,0468	—	—	—	—	—	—	—	Gemischte Kost (wie gewöhnl.).
1270	1,021	„	$\alpha_1 = 52^0\,00'$ $\alpha_2 = 37^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0444$	3,23	41,027	0,0693	0,880	0,0092	0,1168	293	$\alpha_1 = 68^0\,18'$ $\alpha_2 = 16^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}1769$	1,70	4,981	0,2760	11,04	Milch + Brot.
1520	1,019	„	$\alpha_1 = 45^0\,48'$ $\alpha_2 = 39^0\,00'$	$\varepsilon = 0{,}0207$	1,02	15,504	0,0323	0,491	0,0045	0,0684	228	$\alpha_1 = 59^0\,54'$ $\alpha_2 = 38^0\,00'$	$\varepsilon = 0{,}0688$	1,80	4,104	0,1070	4,28	Milchkost + 20 mg Indol.
890	1,030	„	$\alpha_1 = 50^0\,48'$ $\alpha_2 = 40^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}0299$	1,76	15,664	0,0466	0,415	0,0100	0,0890	608	$\alpha_1 = 51^0\,30'$ $\alpha_2 = 36^0\,42'$	$\varepsilon = 0{,}0454$	0,41	2,493	0,0708	3,20	Milchkost + Milchzucker + Rohrzucker, Diarrhöe!
1090	1,025	„	$\alpha_1 = 45^0\,48'$ $\alpha_2 = 40^0\,48'$	$\varepsilon = 0{,}0132$	0,83	9,047	0,0206	0,391	0,0092	0,1003	478	$\alpha_1 = 43^0\,18'$ $\alpha_2 = 40^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}00823$	0,35	1,673	0,0128	0,512	Milchkost + Zucker + 20 mg Indol.
790	1,028	„	$\alpha_1 = 49^0\,00'$ $\alpha_2 = 43^0\,48'$	$\varepsilon = 0{,}0158$	1,76	13,904	0,0246	0,194	0,0078	0,0613	125	$\alpha_1 = 48^0\,06'$ $\alpha_2 = 43^0\,00'$	$\varepsilon = 0{,}0154$	0,67	0,838	0,0240	0,96	Milchkost + Fett.
870	1,027	„	$\alpha_1 = 50^0\,30'$ $\alpha_2 = 39^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0344$	—	—	0,0537	0,467	0,0108	0,0939	83	$\alpha_1 = 53^0\,42'$ $\alpha_2 = 36^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0539$	0,90	0,747	0,0841	3,62	do.
880	1,024	„	$\alpha_1 = 51^0\,12'$ $\alpha_2 = 39^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0357$	1,78	15,664	0,0557	0,590	0,0073	0,0642	113	$\alpha_1 = 55^0\,42'$ $\alpha_2 = 34^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}0657$	—	—	0,102	4,08	do.
1070	1,023	„	$\alpha_1 = 47^0\,18'$ $\alpha_2 = 33^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0438$	1,46	15,622	0,0683	0,731	0,0100	0,1070	223	$\alpha_1 = 43^0\,00'$ $\alpha_2 = 39^0\,18'$	$\varepsilon = 0{,}0113$	0,56	1,249	0,0176	0,704	Milchkost + Fett + 20 mg Indol.
1200	1,022	„	$\alpha_1 = 51^0\,12'$ $\alpha_2 = 33^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0547$	1,24	14,880	0,0853	1,020	0,0146	0,1752	168	$\alpha_1 = 68^0\,24'$ $\alpha_2 = 18^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}1770$	—	—	0,276	11,00	Milch + Brot.
980	1,026	„	$\alpha_1 = 52^0\,48'$ $\alpha_2 = 38^0\,06'$	$\varepsilon = 0{,}0451$	1,51	14,798	0,0704	0,689	0,0082	0,0804	93	$\alpha_1 = 59^0\,12^0$ $\alpha_2 = 30^0\,48^0$	$\varepsilon = 0{,}0898$	1,50	1,395	0,140	5,60	do.
820	1,028	„	$\alpha_1 = 51^0\,24'$ $\alpha_2 = 30^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0666$	1,59	13,038	0,1040	0,853	0,0144	0,1181	73	$\alpha_1 = 59^0\,36'$ $\alpha_2 = 24^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}1158$	1,15	0,839	0,181	7,24	Milch + Brot + 200 g Gehirn.
1030	1,028	„	$\alpha_1 = 49^0\,42'$ $\alpha_2 = 39^0\,48'$	$\varepsilon = 0{,}0302$	1,54	15,862	0,0471	0,485	0,0098	0,1009	83	$\alpha_1 = 63^0\,48'$ $\alpha_2 = 25^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}1259$	1,58	1,311	0,196	7,84	do.

Tabelle

Fall

Harn												
Harnmenge in 24 Std. ccm	Spez. Gew.	Reaktion	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	N in 100 ccm g	Gesamt-N g	Indol in 100 ccm mg	Gesamt-Indol mg	Indican in 100 ccm g	Gesamt-Indican g	NaCl in 100 ccm g	Gesamt-NaCl g
1270	1,026	sauer	$\alpha_1 = 51^\circ 12'$ $\alpha_2 = 38^\circ 06'$	$\varepsilon = 0,0400$	1,40	17,778	0,0624	0,792	0,0125	0,1587	1,09	13,84
1260	1,027	„	$\alpha_1 = 49^\circ 48'$ $\alpha_2 = 38^\circ 30'$	$\varepsilon = 0,0345$	1,48	18,648	0,0538	0,678	0,0192	0,2419	1,08	13,61
1260	1,026	„	$\alpha_1 = 51^\circ 42'$ $\alpha_2 = 40^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0351$	1,46	18,396	0,0548	0,690	0,0108	0,1361	1,08	13,61
1670	1,028	„	$\alpha_1 = 49^\circ 24'$ $\alpha_2 = 36^\circ 18'$	$\varepsilon = 0,0400$	1,81	30,227	0,0624	1,040	0,0078	0,1303	0,96	13,03
1650	1,028	„	$\alpha_1 = 54^\circ 06'$ $\alpha_2 = 37^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0520$	2,12	34,98	0,0811	1,340	0,00595	0,099	0,76	12,54
1620	1,027	„	$\alpha_1 = 49^\circ 00'$ $\alpha_2 = 37^\circ 30'$	$\varepsilon = 0,0352$	2,25	36,45	0,0549	0,889	0,0025	0,0405	0,74	11,988
1150	1,030	„	$\alpha_1 = 50^\circ 06'$ $\alpha_2 = 39^\circ 48'$	$\varepsilon = 0,0314$	1,76	20,24	0,0489	0,562	0,0157	0,1806	1,18	13,57
920	1,031	„	$\alpha_1 = 53^\circ 00'$ $\alpha_2 = 39^\circ 24'$	$\varepsilon = 0,0417$	1,86	16,11	0,0651	0,599	0,0295	0,2714	1,05	13,66
1170	1,028	„	$\alpha_1 = 49^\circ 48'$ $\alpha_2 = 39^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0323$	1,55	18,135	0,0504	0,589	0,0115	0,1346	1,24	14,51
1060	1,027	„	$\alpha_1 = 44^\circ 06'$ $\alpha_2 = 33^\circ 18'$	$\varepsilon = 0,0338$	1,60	16,96	0,0527	0,559	0,0114	0,1208	0,99	10,49
1230	1,026	„	$\alpha_1 = 53^\circ 42'$ $\alpha_2 = 39^\circ 48'$	$\varepsilon = 0,0426$	1,39	17,09	0,0665	0,818	0,0208	0,2585	1,17	14,39
1220	1,027	„	$\alpha_1 = 55^\circ 00'$ $\alpha_2 = 41^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0425$	1,29	15,74	0,0663	0,809	0,0180	0,2196	1,29	15,74
1580	1,027	„	$\alpha_1 = 51^\circ 48'$ $\alpha_2 = 42^\circ 54'$	$\varepsilon = 0,0272$	1,44	22,75	0,0424	0,669	0,0185	0,2923	1,30	20,54
1460	1,029	„	$\alpha_1 = 50^\circ 00'$ $\alpha_2 = 40^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0299$	1,79	26,13	0,0466	0,680	0,0278	0,4059	1,29	18,83
1470	1,029	„	$\alpha_1 = 44^\circ 24'$ $\alpha_2 = 34^\circ 12'$	$\varepsilon = 0,0317$	2,28	33,52	0,0495	0,727	0,0148	0,2176	1,25	18,38
1200	1,029	„	$\alpha_1 = 44^\circ 36'$ $\alpha_2 = 34^\circ 30'$	$\varepsilon = 0,0314$	1,89	22,68	0,0400	0,588	0,0139	0,1668	1,09	13,08
1320	1,028	„	$\alpha_1 = 54^\circ 12'$ $\alpha_2 = 33^\circ 48'$	$\varepsilon = 0,0631$	1,64	21,65	0,0985	1,300	0,0078	0,1023	1,07	13,16
2050	1,017	„	$\alpha_1 = 51^\circ 30'$ $\alpha_2 = 39^\circ 30'$	$\varepsilon = 0,0367$	0,91	18,66	0,0573	1,170	0,0050	0,1025	0,85	17,43

III.
M.

Faeces									Nahrung
Faecesmenge in 24 Std. g	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	N in verarbeit. Faeces g	Gesamt-N g	Indol in verarbeit. Faeces mg	Gesamt-Indol mg	NaCl in verarbeit. Faeces g	Gesamt-NaCl g	
240	$\alpha_1 = 78^0 54'$ $\alpha_2 = 8^0 42'$	$\varepsilon = 0{,}3045$	0,0232	2,32	0,475	19,00	0,00351	0,0702	Milchkost = 2250 ccm Milch + 600 g Schwarzbrot.
230	$\alpha_1 = 72^0 48'$ $\alpha_2 = 15^0 42'$	$\varepsilon = 0{,}2120$	0,0193	1,93	0,331	13,20	0,00877	0,175	do. + 20 mg Indol.
125	$\alpha_1 = 71^0 12'$ $\alpha_2 = 17^0 00'$	$\varepsilon = 0{,}1965$	0,0249	2,49	0,307	12,30	0,00350	0,0702	Milchkost.
230	$\alpha_1 = 77^0 12'$ $\alpha_2 = 10^0 36'$	$\varepsilon = 0{,}2743$	0,0266	2,66	0,428	17,10	0,00819	0,164	Milchkost + 160 g Gelatine.
230	$\alpha_1 = 76^0 48'$ $\alpha_2 = 13^0 12'$	$\varepsilon = 0{,}2519$	0,0253	2,53	0,393	15,70	0,00702	0,140	Milchkost + 160 g Gelatine + 20 mg Indol.
340	$\alpha_1 = 75^0 36'$ $\alpha_2 = 12^0 48'$	$\varepsilon = 0{,}2468$	0,0327	3,27	0,385	15,40	0,0117	0,234	Milchkost + 160 g Gelatine.
350	$\alpha_1 = 82^0 06'$ $\alpha_2 = 7^0 30'$	$\varepsilon = 0{,}3474$	0,0289	2,89	0,542	21,70	0,0123	0,246	Milchkost + 200 g Milchzucker.
270	$\alpha_1 = 81^0 30'$ $\alpha_2 = 9^0 06'$	$\varepsilon = 0{,}3242$	0,0266	2,66	0,506	20,20	0,0070	0,140	Milchkost + 200 g Milchzucker + 20 mg Indol.
200	$\alpha_1 = 72^0 48'$ $\alpha_2 = 17^0 12'$	$\varepsilon = 0{,}2037$	0,0202	2,02	0,318	12,70	0,0169	0,230	Milchkost + 200 g Milchzucker.
160	$\alpha_1 = 72^0 30'$ $\alpha_2 = 16^0 48'$	$\varepsilon = 0{,}2043$	0,0154	1,54	0,319	12,80	0,0029	0,058	Milchkost + 170 g Butter.
220	$\alpha_1 = 82^0 12'$ $\alpha_2 = 8^0 30'$	$\varepsilon = 0{,}3578$	0,0216	2,16	0,558	22,30	0,0041	0,082	Milchkost + 170 g Butter + 20 mg Indol.
270	$\alpha_1 = 87^0 30'$ $\alpha_2 = 1^0 06'$	$\varepsilon = 0{,}6133$	0,0263	2,63	0,957	38,30	0,0047	0,094	Milchkost + 170 g Butter.
330	$\alpha_1 = 84^0 30'$ $\alpha_2 = 5^0 06'$	$\varepsilon = 0{,}6132$	0,0371	3,71	0,957	38,30	0,0105	0,310	Milchkost + 200 g Käse.
290	$\alpha_1 = 82^0 18'$ $\alpha_2 = 7^0 48'$	$\varepsilon = 0{,}3465$	0,0210	2,10	0,541	21,60	0,0094	0,180	Milchkost + 200 g Käse + 20 mg Indol.
210	$\alpha_1 = 76^0 30'$ $\alpha_2 = 9^0 48'$	$\varepsilon = 0{,}2764$	0,0190	1,90	0,421	16,00	0,0059	0,118	Milchkost + 200 g Käse.
330	$\alpha_1 = 81^0 36'$ $\alpha_2 = 5^0 54'$	$\varepsilon = 0{,}3633$	0,0278	2,78	0,567	22,70	0,0082	0,164	Milchkost + 9 g Pankreatin.
270	$\alpha_1 = 73^0 30'$ $\alpha_2 = 15^0 00'$	$\varepsilon = 0{,}2200$	0,0219	2,19	0,390	15,60	0,0094	0,188	Milchkost + Vegetabilien.
380	$\alpha_1 = 70^0 30'$ $\alpha_2 = 21^0 12'$	$\varepsilon = 0{,}1724$	0,0287	2,87	0,269	10,70	0,0140	0,280	Milchkost + Vegetabilien + 20 mg Indol.

Tabelle

Harn													
Harnmenge in 24 Std. ccm	Spez. Gew.	Reaktion	Abgelesene Winkel	Extinktions-koeffizient	N in 100 ccm g	Gesamt-N g	Indol in 100 ccm mg	Gesamt-Indol mg	Indican in 100 ccm g	Gesamt-Indican g	NaCl in 100 ccm g	Gesamt-NaCl g
1330	1,025	sauer	$\alpha_1 = 50^0\,24'$ $\alpha_2 = 37^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0395$	1,47	19,55	0,0616	0,819	0,0082	0,1091	0,94	12,50
1200	1,028	"	$\alpha_1 = 52^0\,30'$ $\alpha_2 = 43^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0275$	1,60	19,20	0,0429	0,515	0,0210	0,2520	1,06	12,72
1450	1,023	"	$\alpha_1 = 47^0\,30'$ $\alpha_2 = 40^0\,18'$	$\varepsilon = 0{,}0219$	1,32	19,14	0,0361	0,523	0,0149	0,2161	0,88	12,76
1150	1,027	"	$\alpha_1 = 50^0\,18'$ $\alpha_2 = 40^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}0508$	1,56	17,94	0,0792	0,911	0,0083	0,0955	1,05	12,08
1500	1,027	"	$\alpha_1 = 48^0\,30'$ $\alpha_2 = 39^0\,00'$	$\varepsilon = 0{,}0289$	1,61	24,15	0,0451	0,677	0,0166	0,2490	0,90	13,50
1660	1,026	"	$\alpha_1 = 47^0\,30'$ $\alpha_2 = 38^0\,42'$	$\varepsilon = 0{,}0268$	1,45	24,07	0,0418	0,694	0,0157	0,2606	1,11	18,33
930	1,020	"	$\alpha_1 = 51^0\,48'$ $\alpha_2 = 33^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0567$	1,06	9,86	0,0885	0,823	0,0075	0,0697	0,57	5,30
730	1,022	"	$\alpha_1 = 57^0\,12'$ $\alpha_2 = 37^0\,42'$	$\varepsilon = 0{,}0508$	1,32	9,64	0,0792	0,578	0,0178	0,1289	0,57	4,16
1050	1,029	"	$\alpha_1 = 48^0\,30'$ $\alpha_2 = 36^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}0365$	1,54	16,17	0,0569	0,597	0,0158	0,1659	1,10	11,55
1000	1,028	"	$\alpha_1 = 60^0\,06'$ $\alpha_2 = 29^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0955$	1,24	12,40	0,1480	1,480	0,0220	0,2200	1,26	12,60
840	1,026	"	$\alpha_1 = 57^0\,30'$ $\alpha_2 = 36^0\,06'$	$\varepsilon = 0{,}0634$	1,63	13,69	0,0989	0,791	0,0187	0,1571	0,94	7,89

Ergebnisse.

1. Es wurde die Menge des durch die Destillation des Harnes gewonnenen Körpers, der die Indolreaktion gibt, mit der Indicanmenge des Harnes bei verschiedener Ernährungsweise verglichen und dabei eine Steigerung bei Fettnahrung, bei Vegetabilien und bei Gelatinenahrung, ein Fallen bei Kohlenhydraten und Zuckernahrung gefunden. Eiweißzusatz bewirkt eine Steigerung gegenüber den Kohlenhydraten, ein Fallen dem Fett gegenüber. Eine Relation zwischen Kotindol und Harnindican ist nicht zu finden.

2. Es wurde das Kotindol sowohl im Kote direkt als auch nach der nochmaligen Fäulnis bestimmt und dadurch gefunden, daß

III (Fortsetzung).

Faecesmenge in 24 Std. g	Faeces								Nahrung
	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	N in verarbeit. Faeces g	Gesamt-N g	Indol in verarbeit. Faeces mg	Gesamt-Indol mg	NaCl in verarbeit. Faeces g	Gesamt-NaCl g	
250	$\alpha_1 = 78^0\,36'$ $\alpha_2 = 10^0\,18'$	$\varepsilon = 0{,}2872$	0,0556	5,56	0,448	17,90	0,0064	0,128	Gemischte Kost.
340	$\alpha_1 = 83^0\,30'$ $\alpha_2 = 7^0\,48'$	$\varepsilon = 0{,}3613$	0,0262	2,62	0,464	18,60	0,0111	0,111	Gemischte Kost + 200 g Zucker.
290	$\alpha_1 = 78^0\,54'$ $\alpha_2 = 10^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}2904$	0,0189	1,89	0,453	18,10	0,0094	0,187	do.
430	$\alpha_1 = 56^0\,30'$ $\alpha_2 = 36^0\,30'$	3 fach zu nehmen! $\varepsilon = 0{,}0620$	0,0358	3,58	0,290	15,60	0,0164	0,328	Gemischte Kost + 200 g Butter.
330	$\alpha_1 = 80^0\,30'$ $\alpha_2 = 7^0\,48'$	$\varepsilon = 0{,}3279$	0,0255	2,55	0,512	20,50	0,0129	0,258	Gemischte Kost + 20 Stück Eigelb.
520	$\alpha_1 = 86^0\,48'$ $\alpha_2 = 4^0\,36'$	$\varepsilon = 0{,}4694$	0,0402	4,02	0,732	29,30	0,0205	0,410	Gemischte Kost + 300 g Gehirn.
170	$\alpha_1 = 64^0\,12'$ $\alpha_2 = 29^0\,06'$	$\varepsilon = 0{,}1540$	0,0157	1,57	0,240	9,60	0,0053	0,106	300 g Maismehl + Vegetabilien.
70	$\alpha_1 = 54^0\,06'$ $\alpha_2 = 37^0\,30'$	$\varepsilon = 0{,}0511$	0,00756	0,76	0,0797	3,20	0,0023	0,046	do. + 200 g Fett.
230	$\alpha_1 = 66^0\,06'$ $\alpha_2 = 21^0\,18'$	$\varepsilon = 0{,}1525$	0,0153	1,53	0,238	9,50	0,0120	0,240	150 g Fleisch, 150 g Käse, 300 g Brot, Vegetabilien.
510	$\alpha_1 = 85^0\,48'$ $\alpha_2 = 5^0\,00'$	$\varepsilon = 0{,}4384$	0,0639	6,39	0,694	27,80	0,0211	0,422	do. + 200 g Fett.
230	$\alpha_1 = 69^0\,06'$ $\alpha_2 = 23^0\,12'$	$\varepsilon = 0{,}1572$	0,0169	1,69	0,245	9,80	0,0094	0,187	do. + reichlich Rohrzucker.

das Kotindol durch Fett sowohl im Kote als auch bei der Nachgärung reichlich vermehrt wird, daß dies bei eiweißreicher Nahrung ebenfalls zutrifft, daß die Kohlenhydrate den Indolgehalt in beiden Portionen herabsetzen, die Vegetabilien dagegen das Eiweiß vor Fäulnis schützen; in der Nachgärung dagegen findet man um so mehr Indol.

3. Dasselbe Verhalten zeigen der Stickstoff und die Chloride des Kotes.

4. Das Indican des Harnes zeigt oft einen direkten Zusammenhang mit dem Indol des Kotes, indem es mit demselben steigt und fällt. Bei Gelatine, Zucker und Fett scheint jedoch der allgemeine Stoffwechsel die aus dem Darm resorbierte Indol-

Tabelle IV.

Indol in der Nachverdauung.

Diät	Verarbeitete Faecesmenge	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	Indol in d. verarb. Faeces g	Gesamt-Indol g	Bemerkungen
Gelatine	200 ccm = 68 g	$\alpha_1 = 76^\circ 36'$ $\alpha_2 = 10^\circ 36'$	$\varepsilon = 0{,}2702$	0,000422	0,00211	Die Faeces wurden jeweilen mit H_2O auf 1 l verdünnt und davon je 25 ccm untersucht.
Zucker	25 ccm	$\alpha_1 = 84^\circ 30'$ $\alpha_2 = 2^\circ 18'$	$\varepsilon = 0{,}4825$	0,000733	0,0293	—
Fett	75 „	$\alpha_1 = 86^\circ 30'$ $\alpha_2 = 2^\circ 06'$	$\varepsilon = 0{,}5298$	0,000826	0,0110	—
Eiweiß	75 „	$\alpha_1 = 71^\circ 18'$ $\alpha_2 = 15^\circ 30'$	$\varepsilon = 0{,}2055$	0,000321	0,0257	6 fach verdünnt
Pankreatin	25 „	$\alpha_1 = 62^\circ 12'$ $\alpha_2 = 30^\circ 36'$	$\varepsilon = 0{,}1012$	0,000158	0,0063	—
Vegetabilien . . .	50 „	$\alpha_1 = 87^\circ 48'$ $\alpha_2 = 3^\circ 12'$	$\varepsilon = 0{,}5336$	0,000832	0,0666	4 fach verdünnt
Gemischte Kost .	25 „	$\alpha_1 = 83^\circ 48'$ $\alpha_2 = 2^\circ 06'$	$\varepsilon = 0{,}4799$	0,000749	0,0899	3 fach „
Gem. Kost + Zucker	50 „	$\alpha_1 = 88^\circ 42'$ $\alpha_2 = 1^\circ 18'$	$\varepsilon = 0{,}6576$	0,001026	0,0821	4 fach „
Gem. Kost + Fett .	25 „	$\alpha_1 = 73^\circ 30'$ $\alpha_2 = 12^\circ 48'$	$\varepsilon = 0{,}2344$	0,000366	0,1187	8 fach „
Gem. Kost + Eigelb	50 „	$\alpha_1 = 88^\circ 24'$ $\alpha_2 = 0^\circ 42'$	$\varepsilon = 0{,}6934$	0,001082	0,0866	4 fach „
Mais	25 „	$\alpha_1 = 81^\circ 36'$ $\alpha_2 = 8^\circ 54'$	$\varepsilon = 0{,}1272$	0,000198	0,0158	2 fach „
Mais + Fett . . .	25 „	$\alpha_1 = 59^\circ 06'$ $\alpha_2 = 32^\circ 30'$	$\varepsilon = 0{,}0837$	0,000131	0,0105	2 fach „
Gem. Kost	25 „	$\alpha_1 = 73^\circ 42'$ $\alpha_2 = 17^\circ 48'$	$\varepsilon = 0{,}2054$	0,000320	0,0640	5 fach „
Gem. Kost + Fett .	25 „	$\alpha_1 = 83^\circ 48'$ $\alpha_2 = 7^\circ 30'$	$\varepsilon = 0{,}3689$	0,000575	0,1150	5 fach „
Gem. Kost + Zucker	25 „	$\alpha_1 = 60^\circ 00'$ $\alpha_2 = 26^\circ 30'$	$\varepsilon = 0{,}1082$	0,000169	0,0135	2 fach „

menge zu beeinflussen, was auch bei künstlichem Indolzusatz zur Nahrung zum Ausdruck kommt.

5. Das Indican des Harnes ist somit erstens durch die aufgesaugte Indolmenge bestimmt, zweitens durch die Toleranz des Organismus für Indol, d. h. durch die Fähigkeit, mehr oder weniger Indol zum Verschwinden zu bringen. Bei einer Indicanurie sind beide Faktoren zu berücksichtigen.

Tabelle V.

Normale Diät.

Name	Harnmenge in 24 Std. ccm	Spez. Gew.	Reaktion	Abgelesene Winkel	Extinktionskoeffizient	Indol in 100 ccm ccm	Indol im Gesamtharn ccm	Indican in 100 ccm ccm	Indican im Gesamtharn ccm	Bemerkungen
Dr. W. v. M.	1350	1,026	sauer	$\alpha_1 = 50^\circ\ 18'$ $\alpha_2 = 37^\circ\ 06'$	$\varepsilon = 0{,}0404$	0,0630	0,851	0,0048	0,0649	Beobachtung nach der gewohnten Kost.
Dr. E. H.	1315	1,027	„	$\alpha_1 = 51^\circ\ 36'$ $\alpha_2 = 34^\circ\ 48'$	$\varepsilon = 0{,}0518$	0,0808	1,060	0,0040	0,0526	do.
H. B.	1300	1,024	„	$\alpha_1 = 49^\circ\ 30'$ $\alpha_2 = 32^\circ\ 12'$	$\varepsilon = 0{,}0539$	0,0841	1,100	0,0036	0,0468	do.
W. M.	2000	1,018	„	$\alpha_1 = 52^\circ\ 24'$ $\alpha_2 = 39^\circ\ 48'$	$\varepsilon = 0{,}0385$	0,0578	1,160	0,0023	0,0460	do.
Dr. W. v. M.	1350	1,026	„	$\alpha_1 = 47^\circ\ 54'$ $\alpha_2 = 39^\circ\ 00'$	$\varepsilon = 0{,}0271$	0,0423	0,571	0,0104	0,1404	do. + 30 mg Indol
H. B.	1280	1,024	„	$\alpha_1 = 46^\circ\ 00'$ $\alpha_2 = 36^\circ\ 48'$	$\varepsilon = 0{,}0282$	0,0439	0,562	0,0072	0,0912	do.

Über die bei künstlicher Verdauung und Fäulnis verschiedener Eiweißkörper auftretenden Indolmengen.

Von

W. von Moraczewski.

(Aus dem Laboratorium des physiologischen Instituts der Universität Palermo und dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik in Zürich.)

(Eingegangen am 13. Mai 1913.)

Ich habe vor einigen Jahren meine Beobachtungen über die Relation von Indican und Kotindol mitgeteilt[1]) und dabei verschiedene Eigentümlichkeiten über das Verhalten des Indols und des Indicans betont. So wurde unter anderem eine Steigerung des Kotindols bei zuckerreicher Nahrung beobachtet; ich fand, daß ein Fettzusatz zur Nahrung die Menge des Indicans regelmäßig steigert, daß nucleinhaltige Stoffe wie Thymus, Gehirn usw. die gleiche Steigerung der Indicanmenge hervorrufen usw. Da ich nun andererseits eine ziemlich genaue Methode der Indolbestimmung ausgearbeitet hatte, so schien es mir möglich, einer Frage näher zu treten: wieviel Indol wird bei künstlicher Verdauung der Eiweißstoffe gebildet? und weiter: kann man die Indolmenge steigern oder beeinflussen, ist sie für alle Eiweißstoffe konstant?

Wenn man die Literatur über die Indolmengen der Eiweisstoffe betrachtet, so findet man darüber recht spärliche Angaben.

So sagt Abderhalden[2]) vom Tryptophan, daß es in den meisten Proteinen „vorhanden" sei, die Menge aber wird nur beim Casein angegeben, und soll dort 0,5 bis 1,5 % ausmachen. Aus 2000 g Casein haben die Entdecker des Tryptophans Hopkins und Cole[3])

---

[1]) Boas, Arch. f. Verdauungsber. 14, 375. — Zeitschr. f. klin. Med. 54, 475.

[2]) Lehrb. d. physiol. Chem. 1907.

[3]) Hopkins und Cole, Journ. of Physiol. 27, 418.

5 bis 8 g Tryptophan erhalten, Abderhalden[1]) 8 g, Osborne und Hanis[2]) geben an, daß das Edestin sehr wenig Tryptophan, das Eiweiß der Walnuß das meiste enthält, aber Zahlenangaben habe ich nur bei Hugo Fasal[3]) gefunden, und zwar gibt dieser Autor die Tryptophanmenge an, die er durch seine colorimetrischen Messungen bestimmt hatte. Bei Fasal findet man auch die Literatur über diesen Gegenstand angeführt. Da nun das Tryptophan die Muttersubstanz des Indols ist, so war es für meine Untersuchungen eine gewisse Kontrolle. Nach Fasal soll das Lactalbumin besonders reich an Tryptophan sein: 3%, dann käme das Gliadin mit 1% [Abderhalden und Samueli[4])], dann das Fibrin mit 1% [Neuberg und Popowski[5])]. Levene und Slyke[6]) finden Tryptophan in Witte-Pepton, Fibrin und Plastein, ohne über die Menge zu berichten.

Was nun die andere Frage angeht, ob man mehr oder weniger Indol aus dem Eiweißkörper gewinnen kann, so läuft diese Frage darauf hinaus, ob man durch entsprechende Anordnung der Versuche die Verluste auf das Minimum reduzieren könne.

Denn man darf wohl kaum annehmen, nach allen, was wir durch Fischers und Abderhaldens Arbeiten über die Zusammensetzung der Eiweißkörper wissen, daß je nach der Art der Zersetzung das Tryptophan reichlicher oder spärlicher in den Spaltungsprodukten vertreten sein könnte.

Der Zweck meiner Arbeit war, die Menge des Indols in den Nahrungsmitteln zu bestimmen, um eine Indolbilanz des Organismus aufzustellen. Ich habe somit auf die Nahrungsmittel als solche Gewicht gelegt und nur zum Teil die Eiweißkörper rein dargestellt, und reine Eiweißkörper der Verdauung unterworfen. Dieses soll meine nächste Aufgabe sein.

Methode.

Ich verfuhr jedesmal so: 1 g trockenes Eiweiß oder eine dieser Menge entsprechende Quantität frisches Eiweiß wurde

---

[1]) Abderhalden und Kempe, Zeitschr. f. physikal. Chem. **52**, 208.

[2]) Osborne und Hanis, Journ. of Amer. Chem. Soc. **25**, zitiert nach Malys Zeitschr. f. Tierchem.

[3]) H. Fasal, diese Zeitschr. **44**, 392.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 276.

[5]) Neuberg und Popowski, diese Zeitschr. 2, 357.

[6]) Ebenda **13**, 457.

in 300 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure gelöst und mit 1 g Pepsinum germanicum versetzt.

Die Vorprüfungen ergaben, daß sowohl Schwankungen in der Säuremenge wie in der Pepsinmenge für die uns interessierende Frage belanglos sind, dagegen die Verdünnung der Eiweißlösung entschieden zu einer vollkommneren Spaltung führt und dadurch wohl auch die Indolmenge steigert.

Die Dauer der Verdauung haben wir auf 24 Stunden beschränkt und stets streng innegehalten, wenn auch hier eine Verlängerung ohne Einfluß war. Kürzere Verdauung wäre vielleicht ebenfalls genügend, da wir aber gefunden haben, daß die tryptische Verdauung hier maßgebend sei, so haben wir überhaupt der Pepsinsalzsäureverdauung keine zu große Bedeutung gegeben.

Nach 24 Stunden wurde die Säure durch eine genau entsprechende Menge Natronlauge abgestumpft, darauf 20 ccm 2 n-Sodalösung (106 g chem. reines, geglühtes Natriumcarbonat in 1 l Wasser) in 200 ccm Wasser zugesetzt — so daß jetzt die Flüssigkeit 500 ccm betrug — und mit 1 g Pankreatinpulver zu weiterer Verdauung gebracht.

Diese Verdauung ist nun für die Indolbildung von entscheidender Bedeutung, und jede Schädigung des Fermentes führt zum Fehlschlagen des Versuchs. Pankreatin ist ungemein empfindlich und man darf nur dann übereinstimmende Ergebnisse erwarten, wenn man genau nach derselben Reihenfolge die Reagenzien zusetzt. Man darf nicht das Pankreatin vor der Abstumpfung der Säure zusetzen, ebensowenig es mit zu starker Sodalösung behandeln. Kurzum, die Arbeitsweise muß stets dieselbe bleiben: Abstumpfen der Säure, Verdünnen auf 500 ccm unter Sodazusatz, Beschicken mit Pankreatin.

Was die Dauer dieser Verdauung angeht, so haben wir der Einfachheit halber 24 Stunden gewählt und festgehalten. Eine diesbezügliche Prüfung ergab aber, daß bereits nach 6 Stunden, ja zuweilen auch schon nach 1 Stunde das Eiweiß die ganze Tryptophangruppe abgespalten hatte[1]).

Nach 24 Stunden Pankreasverdauung werden die 500 ccm

[1]) Dieses will sagen, daß durch darauffolgende Fäulnis alles Indol gewonnen wird.

mit Kot geimpft, wozu natürlich eine ganz geringe Menge Kot ausreicht. Es wurde stets ein erbsengroßes Stück verwendet. Auch hier muß man sehr darauf achten, daß der Kot frisch, nicht getrocknet oder vom vorigen Tage zur Verwendung kommt. Die Fäulnisbakterien sind ebenso empfindlich und wählerisch wie das Pankreatin.

Wir haben natürlich auch nach Reinkulturen der Kotbakterien gegriffen, um gleichmäßige Resultate zu erzielen. Es hat sich herausgestellt, daß man dadurch eine neue Komplikation einführt. Die Kulturen müssen entsprechend alt (2 Tage) sein, und geben schwankende Ergebnisse. Wir haben deshalb nur mit Kot von demselben Individuum stammend gearbeitet und damit gut übereinstimmende Zahlen gewonnen.

Auch hier dauerte die Fäulniswirkung 24 Stunden. Man kann zwar, wie aus vergleichenden Versuchen zu schließen ist, die Fäulnis bis zu 36 Stunden verlängern, ohne Verluste zu bekommen. Auch kann man nach 18 Stunden zuweilen alles Indol gewinnen, aber eine Fäulnis von 2 bis 3 Tagen, geschweige denn von 1 Woche Dauer, führt entschieden zur Abnahme der Indolmenge. Diese Abnahme kann durch Verflüchtigung des Indols, oder durch partielle Zersetzung, oder aber durch Oxydation bedingt sein, — dieser Frage wurde nicht nachgegangen, jedenfalls ist eine Fäulnis von 24 Stunden genügend, um das Maximum des Indols zu gewinnen[1]).

Da unsere Aufgabe darin bestand, die Menge des Indols, die aus 1 g Eiweiß zu gewinnen ist, möglichst genau zu bestimmen, so beschränkten wir uns natürlich nicht auf wenige Versuche, sondern verdauten nebeneinander unter genau gleichen Bedingungen (geimpft durch den gleichen Kot, im gleichen Thermostaten, gleiche Menge und bei gleicher Vorbereitung) meistens drei Proben und stellten für Casein z. B. eine bestimmte Zahl fest (1 g = 0,0030 Indol).

Die Indolmenge wurde nach der von mir angegebenen Methode bestimmt. Wenn auch jetzt durch Herter und

[1]) Es wurde durch besondere Versuche festgestellt, daß durch Verdunsten unter den von uns genannten Bedingungen kein Indol verloren gehe. (Eine Vorlage blieb indolfrei.) Auch wurde durch Luftdurchleitung keine Steigerung erreicht. Hier war natürlich in der Vorlage das von dem Luftstrom mitgerissene Indol nachweisbar.

Foster[1]) und neuerdings durch Moewes[2]), Herzfeld und Baur[3]) neuere Methoden ausgearbeitet sind, habe ich — da meine Versuche begonnen wurden, bevor die Methoden mir bekannt wurden — meine Methode beibehalten, um gleichmäßige Resultate zu gewinnen.

Es wurden von den 500 ccm Verdauungsflüssigkeit genau 300 ccm abdestilliert und davon 100 ccm mit 5 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure angesäuert, daraufhin mit 5 bis 7 Tropfen Natrium nitrit. (0,2 %) versetzt. Da eine größere Menge Indol einer entsprechend größeren Nitritmenge bedarf, um die maximale Rotfärbung zu bewirken, so versetzte ich eine auf die Hälfte verdünnte Lösung des Destillats stets mit der gleichen Nitritmenge, um zu sehen, ob eine größere Nitritmenge nicht eine stärkere Färbung bewirkt.

Somit kamen immer zwei Proben zur colorimetrischen Bestimmung (Colorimeter Dubosque), eine unverdünnt, die andere auf die Hälfte, oft auch mehr verdünnt. Wenn man bei gewissen Eiweißstoffen eine zu starke Indolreaktion gewinnt, so ist es ratsam, das Destillat auf das 10fache zu verdünnen, damit man stets mit der gleichen Masse arbeitet. Die Vergleichsflüssigkeit enthielt 0,000001 Indol auf 1 ccm. Wenn also z. B. eine 8 mal so dünne Schicht nötig war, um eine Normalnuance zu gewinnen, so enthielt das Destillat 0,000008 g Indol in 1 ccm. Da wir nun 300 ccm abdestilliert haben, so war in 1 g angewandtem Eiweiß 0,0024 g Indol enthalten.

Die Zusätze wie Olivenöl, Butter, Galle, Zuckerarten, Dextrin, Stärke haben wir entweder gleich am Anfange der Verdauung gemacht oder am Schluß. Dort, wo durch Salzsäure und Trypsinverdauung keine Spaltung drohte, war es gleichgültig. Bei Dextrin und Stärke, die durch Säure oder Trypsin gespalten werden, haben wir natürlich erst nach der Trypsinverdauung beim Impfen mit Kot zugesetzt, wenn wir die Wirkung der Stoffe und nicht die Wirkung ihrer Spaltungsprodukte erkennen wollten.

---

[1]) Herter und Foster, Journ. of Biolog. Chem. 1, 257, 1906. — Gorter und de Graaf, Compt. rend. Soc. Biol. 1908, 402.

[2]) Curt Moewes, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 11, 555.

[3]) E. Herzfeld und Baur, Centralbl. f. inn. Med. 1918.

Versuche.

1 g Casein enthält 0,12 g N.

1 g Pepsin (Merck) 0,012 g N.

1 g Pankreatin (Merck) 0,013 g N.

I. Bestimmung des Einflusses der Zeit und der Pankreatinmenge.

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g	Indolmenge g	Zeit der Fäulnis
1	1	1	0,0027—0,0033	24 Std.
—	1	5	0,0008—0,0005	24 „
1	1	4	0,0036—0,0040	24 „
1	1	2	0,0038—0,0036	24 „
1	1	2	0,0027—0,0030	48 „
1	1	2	0,0027—0,0025	72 „
1	1	0,7	0,0036	24 „
1	1	0,5	0,0037	24 „
1	1	0,3	0,0034	24 „
1	1	0,1	0,0037	24 „
1	1	1	0	6 „
1	1	0	0,0010—0,0007	24 „
1	1	1	0,0013—0,0020	2 Std. Pankreaseinwirkg., 24 Std. Fäulnis
1	1	1	0,0011—0,0015	
1	1	1	0,0030	3 Std. Pankreaseinwirkg., 24 Std. Fäulnis
1	1	1	0,0012	Pankreaseinwirkung mit Fäulnis zusammen 24 Std.
1	0	1	0,0030	24 Std.
1	1	1	0,0001	6 „
1	1	1	0,0005	9 „
1	1	1	0,0009	12 „
1	1	1	0,0021	18 „

II. Bestimmung des Einflusses der Verdünnung und der Konzentration des Eiweißes.

a)

Albumin g	Pepsin g	Pankreatin g	Indolmenge g	Zeit der Fäulnis
5	1	1	0,0105—0,0120	24 Std.
4	1	1	0,0075—0,0105	24 „
3	1	1	0,0063—0,0070	24 „
2	1	1	0,0037—0,0050	24 „
1	1	1	0,0023—0,0020	24 „
1	1	2	0,0037—0,0030	24 „
1	1	3	0,0025—0,0026	24 „
1	1	4	0,0033—0,0029	24 „

b)

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g	Indolmenge g	Zeit der Fäulnis
4	1	1	0,0084	24 Std.
3	1	1	0,0072	24 "
2	1	1	0,0065	24 "
1	1	1	0,0027—0,0030	24 "
1	1	2	0,0030—0,0033	24 "
1	1	3	0,0036—0,0033	24 "

III. Bestimmung des Indols bei Nucleinfäulnis und Gallenfäulnis.

3 g Galle	1 g Pepsin	1 g Pankreatin	0,0006 g Indol	24 Std.
3 " "	1 " "	3 " "	0,0009 " "	24 "
1 " Nuclein	1 " "	1 " "	0,0002 " "	24 "
3 " "	1 " "	3 " "	0,0006 " "	24 "

IV. Bestimmung des Einflusses der Zuckerarten auf die Indolmenge.

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g		Stunden	Indolmenge g
1	1	3	5 g Dextrose	24	0,0020—0,0010
1	1	3	5 " Lävulose	24	0,0024—0,0015
1	1	3	5 " Lactose	24	0,0030—0,0010
1	1	3	5 " Maltose	24	0,0005—0,0006
1	1	3	5 " Dextrin	24	0,0014—0,0024
1	1	3	5 " Galaktose	24	0,0024—0,0005
1	1	3	5 " Stärke	24	0,0025—0,0009
1	1	3	5 " Rohrzucker	24	0,0010—0,0003
1	1	3	5 " Glycerin	24	0,0024—0,0030

Die Reaktion wurde stets sauer gefunden. Wo man durch Zusatz von Sodalösung die Säure abgestumpft hatte, da wurde mehr Indol gefunden. Auch die nicht gärenden Kohlenhydrate wurden durch die Faecesbakterien z. T. invertiert und der Gärung unterworfen.

V. Der Einfluß der Galle, des Fettes und des Nucleins auf die Indolmenge.

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g		Stunden	Indolmenge g
1	1	3	5 g Olivenöl	24	0,0030—0,0024
3	1	1	5 „ „	24	0,0090
1	1	1	5 „ „	24	0,0036
1	1	1	3 „ Galle	24	0,0024—0,0030
3	1	1	3 „ „	24	0,0090—0,0080
1	1	1	1 „ Nuclein	24	0,0033—0,0030
1	1	3	1 „ „	24	0,0036
3	1	1	1 „ „	24	0,0072—0,0080

Es wurde getrocknete, pulverisierte Galle und Natrium nucleinicum aus Hefe (Merck) zugesetzt.

VI. Einfluß des Fettes und der Kohlenhydrate auf unzersetztes Eiweiß.

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g	Stunden		Indolmenge g
1	0	0	24	Kein Zusatz	0,0005
1	0	0	24	5 g Olivenöl	0,0005
1	0	0	48	Kein Zusatz	0,0015—0,0024
1	0	0	48	5 g Olivenöl	0,0025—0,0030
1	0	0	72	Kein Zusatz	0,0012—0,0016
1	0	0	72	5 g Olivenöl	0,0024—0,0028
1	0	0	96	Kein Zusatz	0,0015—0,0007
1	0	0	96	5 g Olivenöl	0,0025—0,0030
1	0	0	120	Ohne Zusatz	0,0006
1	0	0	120	5 g Olivenöl	0,0012—0,0020
1	0	0	72	2 g Galle	0,0015
1	0	0	24	5 g Traubenzucker	0,0006
1	0	0	48	5 g „	0,0015
1	0	0	72	5 g „	0,0016
1	0	0	96	5 g „	0,0013
1	0	0	120	5 g „	0,0006
1	0	0	144	5 g „	0,0006
1	0	0	24	5 g Rohrzucker	0,0017
1	0	0	48	5 g „	0,0015—0,0018
1	0	0	72	5 g „	0,0017—0,0020
1	0	0	24	5 g Lävulose	—
1	0	0	48	5 g „	0,0012—0,0018
1	0	0	72	5 g „	0,0018—0,0020
1	0	0	96	5 g „	0,0007—0,0009
1	0	0	120	5 g „	0,0003
1	0	0	24	5 g Galaktose	0,0004
1	0	0	48	5 g „	0,0021—0,0024

Casein g	Pepsin g	Pankreatin g	Stunden		Indolmenge g
1	0	0	24	5 g Milchzucker	0,0001
1	0	0	48	5 g "	0,0007
1	0	0	72	5 g "	0,0012
1	0	0	96	5 g "	0,0008
1	0	0	120	5 g "	0,0003
1	0	0	144	5 g "	0,0002
1	0	0	48	5 g Glykogen	0,0007
1	0	0	24	5 g Maltose	0,0005
1	0	0	48	5 g "	0,0018—0,0020
1	0	0	72	5 g "	0,0016—0,0018
1	0	0	96	5 g "	0,0010—0,0014
1	0	0	72	5 g Dextrin	0,0025—0,0030

Ein Zusatz von Kohlenhydraten scheint die Indolbildung etwas zu begünstigen, falls er durch Säurebildung nicht die Fäulnis hemmt.

VII. Die Bestimmung des Indols bei Fäulnis verschiedener Eiweißkörper.

	Pepsin g	Pankreatin g	N g	Indolmenge g
1 g Casein . . .	1	1	0,120	0,0030—0,0036
5 " Tymus . .	1	1	0,116	0,0018
5 " Hoden . .	1	1	0,118	0,0036
10 " " . .	1	1	0,226	0,0075
5 " Eieralbumin	1	1	0,176	0,0028—0,0048
2,5 " "	1	1	0,087	0,0036
5 " Eigelb . . .	1	1	0,186	0,0060—0,0072
1 " Witte-Pepton			0,133	0,0150
0,5 " " "			0,066	0,0075

	N g	Indolmenge g
0,5 g Edestin	0,086	0,0024—0,0034
1 " "	0,176	0,0048—0,0060
1 " Serumalbumin . . .	0,126	0,0065
1 " Hämoglobin (Merck)	0,145	0,0052—0,0048
1 " Lactalbumin . . .	0,197	0,0084
0,5 " " . . .	0,097	0,0042
1 " Harnalbumin . . .	0,149	0,0036
1 " Fibrin	0,1396	0,0096
I. Gehirn	0,0858	0,0042
II. "	0,1215	0,0048
III. "	0,0434	0,0015

	N g	Indolmenge g
I. Leber	0,028	0,0014
II. „	0,026	0,0028
Eieralbumin	0,1677	0,0054
„	0,0838	0,0030—0,0036
Eigelb	0,124	0,0039—0,0060
„	0,248	0,0130
Kalbfleisch	0,112	0,0060
20 ccm Milch	0,136	0,0024
Rindfleisch	0,114	0,0039
5 g Linsen	0,070	0,0018
Schweinefleisch	0,1204	0,0030

Die Fleischsorten wurden so, wie sie aus der Küche geliefert waren, in Arbeit genommen. Eine Portion wurde zur Stickstoffbestimmung, die andere zur Verdauung verwendet. Die ungleichen Resultate beruhen auf der ungleichmäßigen Zusammensetzung (Sehnen, Fett) der verbrauchten Stücke.

Bevor wir die Resultate unserer Untersuchung besprechen, sei nochmals hervorgehoben, was bereits in der Methodik erwähnt wurde, daß die Bedingungen der Indolbildung durch zwei Faktoren bestimmt werden. Erstens ist eine Pankreasverdauung unentbehrlich. Eiweiß, das keiner Pepsinverdauung unterworfen wurde, kann leicht durch Pankreasverdauung fäulnisfähig werden. Dagegen ist bei mangelhafter Pankreasverdauung die Pepsinverdauung nicht imstande, das Eiweiß so zu spalten, daß daraus die maximale Menge Indol durch Fäulnis entstehe. Zweitens ist die Fäulnis für die Menge des Indols maßgebend. Auch bei bester Vorverdauung kann durch kein Mittel, außer der bakteriellen Fäulnis, die maximale Menge Indol entstehen, und jede Störung der Fäulnis, sei es durch Säure, sei es durch Unwirksamkeit der geimpften Bakterien, bringt große Differenzen an Indol. Drittens ist die Verlängerung der Fäulnisdauer meistens schädlich, auch wenn das Indol sich nicht leicht verflüchtigt. Zusatz von Fett schützt das Indol vor der Zersetzung. Es scheint eine Zersetzung des Indols mit der Zeit einzutreten. Das Maximum wird bei einer Dauer von 24 bis 36 Stunden erreicht.

Wir wollen zunächst über die Menge des Indols, die wir bei verschiedenen Eiweißkörpern gewonnen haben, refe-

rieren. Das Casein ist von uns bei allen Versuchen gebraucht worden, und wir können mit Bestimmtheit über die darin enthaltene Indolmenge berichen. Die anderen Eiweißkörper wurden von uns zwei- bis dreimal verdaut, und es ergaben sich oft bedeutende Schwankungen. Es liegt eben alles an der Wirksamkeit der Fäulniserreger. Oft ist ein Nahrungswechsel imstande, die Wirksamkeit des Kotes, mit dem wir impften, so zu beeinflussen, daß die Hälfte der Indolmenge gewonnen wird. Wir haben natürlich immer die maximalen Zahlen für richtig gehalten und die Versuche so lange wiederholt, bis eine annähernd konstante Zahl gewonnen wurde.

Es hat sich nun ergeben, daß das Casein sehr wenig Indol liefert und somit auch wenig Tryptophan enthält. Die von uns untersuchten Eiweißkörper wie Serumalbumin, Fibrin, sogar das für tryptophanarm gehaltene Edestin liefern höhere Zahlen. Es mag sein, daß das Präparieren die Eiweißkörper etwas modifiziert, aber die von uns benutzten Präparate waren stets frisch und stammten von E. Merck. Die Fleischsorten zeigten meistens einen geringeren Indolgehalt, an den des Caseins erinnernd. Die hohe Indolmenge, die wir bei Peptonverdauung gefunden haben, glaube ich darauf zurückführen zu müssen, daß bei der peptischen Verdauung vielleicht eine Abspaltuug der tryptophanfreien Gruppen geschieht, und ein an Tryptophan reicher Kern zurückbleibt[1]).

Die bei den Versuchen gewonnenen Zahlen erlauben wohl gewisse Schlüsse auf den Tryptophangehalt der von uns untersuchten Eiweißkörper zu machen. Das Molekulargewicht des Tryptophans ist, wenn wir die Formel[2]) $C_{11}H_{12}N_2O_2$ zugrunde legen, gleich 204, das des Indols C_8H_7N 117. Somit könnte man die von uns gefundenen Indolmengen beinahe verdoppeln, um auf die Tryptophanmenge zu kommen. Tut man dieses, so ergibt sich bei Casein 0,6 % Tryptophan, eine Zahl, die der

[1]) Wenn wir das Tryptophan mit dem Leucin vergleichen, so finden wir vielleicht geringere Schwankungen, was mit der Flüchtigkeit der Tryptophangruppe zusammenhängen mag.

[2]) Ellinger, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, **38**, **39**, **40**. — Derselbe, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 55. — Neuberg, Charité-Annalen **30**, 424. — Neuberg und Popowski, diese Zeitschr. 2, 357. — R. A. Allers, diese Zeitschr. **6**, 272. — Levene und Slyke, diese Zeitschr. **18**, 457. — H. Fasal, diese Zeitschr. **44**, 392.

von Fasal angegebenen nahekommt. Daß die anderen Forscher Hopkins und Cole, Neuberg usw. weniger Tryptophan erhalten haben (aus 600 g Fibrin 8 g Tryptophan, oder aus 1 g Fibrin 0,014 g ist der Wert von Neuberg), beruht zum Teil darauf, daß sie das Tryptophan rein darstellten, wobei natürlich Verluste unvermeidlich sind, zum Teil wohl auch darauf, daß die Mutterlaugen unberücksichtigt geblieben sind und daß sie die Verdauung entschieden zu lange und in zu konzentrierter Lösung ausführten.

Was den Einfluß von Zuckerarten, Dextrin und Stärke auf die Fäulnis anbelangt, so ist vor allem hervorzuheben, daß die alkoholische und saure Gärung, die durch die Testbakterien angeregt wird, entschieden die Indolmenge vermindert[1]).

Die Flüssigkeit wird sauer und jede Fäulnis hört auf. Dieses Resultat zeigen sämtliche vergärbaren Zuckerarten. (Vgl. M. Bertrand, Annales de l'Inst. Pasteur 1, 27, 78.)

Die nicht gärenden Zucker, Stärke und Dextrin haben auf die Indolmenge keinen Einfluß, falls sie nicht zum Teil doch in vergärbare Zucker gespalten werden.

Setzt man zu einer Eiweißlösung Fäulnisbakterien und Dextrin hinzu, ohne vorher das Eiweiß einer peptischen und tryptischen Verdauung unterworfen zu haben, so scheint das Dextrin eine raschere Eiweißzersetzung zu bewirken. Das Eiweiß gibt die größte Indolmenge ohne Vorverdauung nach drei Tagen, mit Dextrinzusatz scheint die Menge schon nach zwei Tagen erreicht zu sein. Auch ist die Indolmenge mit Dextrinzusatz manchmal größer als ohne Dextrin.

Fett und Galle scheinen die Verluste zu verhindern. Sie vermögen nicht mehr Indol zu geben, sie geben aber regelmäßig das Maximum, das sonst nur unter besonders günstigen Bedingungen erreicht wird. Auch kann jedes Fett, das flüssige Paraffin nicht ausgenommen, dazu beitragen, daß ein langer Aufenthalt im Brutofen die Menge des Indols nicht herabsetzt, was ohne Fettzusatz stets der Fall ist.

Das nucleinsaure Natron gibt unter keinen Umständen Indol,

---

[1]) Dies wurde bereits von A. Hirschler (Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 306) beobachtet. Dementsprechend fand Kraus (Zeitschr. f. physiol. Chem. 18), daß Brotzusatz zur Nahrung das Indican des Harnes vermindert.

auch ein Zusatz zu anderen Eiweißarten vermag nicht die Indolmenge zu steigern.

Dies ist um so merkwürdiger, als alle nucleinhaltige Nahrung das Indican des Harnes steigert; wir waren deshalb geneigt zu glauben, daß uns die Versuche Aufschluß über die Fäulnisvorgänge im Darm geben würden.

Da durch die saure Gärung der Einfluß der Kohlenhydrate erklärt worden ist, so durften wir den Einfluß von Fett ebenfalls auf die von uns beobachtete Eigenschaft, das Indol freizumachen und zu retinieren, zurückführen und damit die Steigerung des Indicans bei Fettnahrung in Zusammenhang bringen. Eine solche Indicansteigerung beobachteten wir aber auch nach Gehirn-, Thymusverabreichung, eine Erklärung dafür ist aber in der Verdauung der betreffenden Substanzen nicht zu finden.

Die gewonnenen Zahlen erlauben weiter gewisse Schlüsse zu ziehen auf die Menge des Indols, die dem Organismus zur Verfügung steht. Nehmen wir die für Casein gewonnene Zahl 0,3 % als Durchschnitt und nehmen wir ferner an, der Mensch nehme täglich etwa 100 g Eiweiß zu sich, so ist, falls alles Indol zur Abspaltung kommt, eine Menge von 0,3 in dem Darminhalte enthalten. Dieses Indol würde, falls es zu Indigo verarbeitet wird, entsprechend der Formel

$$C_6H_4\left\langle{CO \atop NH}\right\rangle C = C\left\langle{CO \atop NH}\right\rangle C_6H_4 \quad \text{aus} \quad 2\,C_8H_7N$$

sich dem Gewichte nach wie 262 zu 234 (Indol) verhalten, also etwas mehr als 0,3 Indigo ausmachen.

Diese Rechnung dürfte natürlich nur dann gelten, wenn alles Eiweiß in Fäulnis übergeht, was ja keineswegs der Fall sein kann und auch nie der Fall ist. Das meiste Eiweiß wird ja resorbiert, und wie Ellinger und Gentzen (Beitr. z. chem. Physiol u. Pathol. 4, 171) zeigten, wird ja das per os gegebene Tryptophan ebenfalls glatt resorbiert und bewirkt keine Steigerung des Harnindicans.

Abgesehen von der Frage, ob das Eiweiß vor der Resorption mehr oder weniger abgebaut wird. dürfen wir jedenfalls annehmen, daß nur jenes Tryptophan zur Fäulnis kommt, das auf dem langen Wege des Dünndarmes nicht aufgenommen

wurde. Dies erklären ja auch die Versuche von Jaffé und Ellinger, die durch Dünndarmunterbindung und dadurch erreichte Resorptionsstörung eine Indicansteigerung bewirkten.

Bei der Aufstellung einer Bilanz des Indols müssen wir also von der Gesamtmenge des zu bildenden Indols die Menge abziehen, die durch das Aufsaugen des Tryptophans nicht zur Geltung kommt, weiterhin diejenige Menge, die durch das nicht zersetzte Eiweiß verloren geht.

Ich habe nun in einer mit Dr. E. Herzfeld publizierten Arbeit diese Menge zu bestimmen gesucht, indem ich den Kot nach dem Abdestillieren des Indols einer abermaligen Fäulnis unterwarf.

Die so gewonnenen Mengen sind meist den aus dem Kot durch sofortige Destillation erhaltenen gleich, sie zeigen nur bei schlecht ausnutzbarer vegetabilischer Nahrung höhere Werte.

Jedenfalls sind die im Kote gefundenen Mengen im Vergleich mit der ganzen Menge, die man von der täglichen Eiweißaufnahme erwartet, sehr gering.

Wenn wir 100 g Eiweiß täglich aufnehmen, so könnten wir daraus 0,3 Indol und ebensoviel Indican gewinnen. Im Kote sind 0,02 Indol und in der Nachgärung ebensoviel enthalten. Dementsprechend müßte, wenn auch das Indol (40 bis 50%) zum Teil verbrennen würde, wie die Versuche von Ed. Wang, M. Kaufmann, W. v. Moraczewski[1]) lehren, etwa 0,15 g Indol ausgeschieden werden. Wir finden aber kaum den dritten Teil im Harn.

Somit müssen wir annehmen, daß der größte Teil des Tryptophans gar nicht zur Fäulnis kommt, und dies erklärt, warum bei reichlicher Eiweißkost das Harnindoxyl recht niedrig sein kann. Die Tryptophangruppe gehört zu den wichtigsten Ernährungsfaktoren. Tryptophanfreie Gelatine und überhaupt tryptophanfreie Spaltungsprodukte genügen nicht zum Stickstoffgleichgewicht (Hopkins, Henriques, Abderhalden).

Das Tryptophan wird wohl zum größten Teil resorbiert, und es frägt sich, ob wir ein Mittel besitzen, die Menge des resorbierten Tryptophans zu messen.

---

[1]) Edwin Wang, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27. — Max Kaufmann, ebenda 71. — W. v. Moraczewski, Arch. di fisiol. e pathol. Palermo 1911.

Dieses Mittel suchten wir in der Bestimmung des durch die Destillation des Harnes gewonnenen Indols. Bekanntlich hat Jaffé[1]) gezeigt, daß man durch Destillation Indol aus dem Harne gewinnen kann und daß dieses Indol nicht aus dem Indican des Harnes stamme. Die Versuche, die Dr. Willy Kaufmann im hiesigen Laboratorium gemacht hat, bestätigen dies. Es ließ sich aber aus manchen Zahlen die Vermutung machen, daß die Indolmenge desto höher ausfällt, je niedriger das Indoxyl des Harnes ist, und umgekehrt. Je weniger Indol im Harne, desto höher der Indoxylgehalt. Es war nun denkbar, die Indolmenge des Harnes zur näheren Kenntnis der Indolbilanz im Körper zu benutzen und damit der Frage über die Quellen des Indicans und seine Bedeutung näherzutreten.

Leider hat sich bei weiteren Versuchen herausgestellt, daß das Indol des Harnes in keinem so einfachen Zusammenhange weder mit dem Indol der Faeces, noch mit dem Indican des Harnes stehe.

Wir sind also noch weit davon entfernt, eine richtige Indol- oder Tryptophanbilanz aufstellen zu können, und die obengenannten Versuche sollen vielmehr nur die Menge des durch die Fäulnis gewonnenen Indols angeben, die als Faktor bei der Beurteilung der Indicanmenge dienen kann.

Ergebnisse.

1. Es wurde die Indolmenge, die bei künstlicher Verdauung von Casein entsteht, bestimmt und der Einfluß von Zucker-, Fett-, Gallezusatz usw. auf die Indolmenge ermittelt.

2. Es wurden die Bedingungen, unter denen das Indol entstehen kann: Pankreasverdauung und Fäulnis, näher bestimmt.

3. Verschiedene Eiweißarten wurden der Verdauung und der Fäulnis unterzogen und dabei die verschiedenen Indolmengen, die jeder Eiweißart eigen sind, gemessen.

---

[1]) Jaffé, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 56, 299, 1908.

Präzisionsureometer (Harnstoffmesser) zur Bestimmung des Harnstoffgehaltes im Harn, im Blute und in der Cerebrospinalflüssigkeit. — Über die Größe der Nieren- und Lebertätigkeit[1].

Von

Heyninx.

(Aus dem Krankenhaus-Laboratorium zu Brüssel.)

(Eingegangen am 3. Mai 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

1. Beschreibung des Apparates.

Dieses Ureometer ist für Verwendung von Natriumhypobromit eingerichtet und besteht daher aus zwei Teilen: der eine Teil dient der Stickstoffentwicklung und der andere zur Bestimmung dieses Gases.

Erster Teil. Wie beigegebene Figur zeigt, besteht dieser Teil aus einem Gefäß von zylindrischer Form, das $5\,^1/_2$ cm hoch, 4 cm an der Öffnung und 6 cm am Fuße breit ist. Es besteht aus dickwandigem Glas; sein Gesamtgewicht beträgt ungefähr 110 g, wodurch die Stabilität des Apparates gesichert wird[2]. In dieses Gefäß gießt man 10 ccm Natriumhypobromitlösung von bekannter Stärke, wie man sie gewöhnlich in den Kliniken zur Harnstoffbestimmung mittels des Apparates von Depaire anwendet[3].

Außerdem gehört zum Apparat eine Glasschale von 10 ccm Inhalt mit einer Handhabe in der Mitte, die den Zweck hat,

---

[1]) Diese Mitteilung wurde im Februar 1913 der „Klinischen Gesellschaft der Krankenhäuser von Brüssel" vorgelegt.

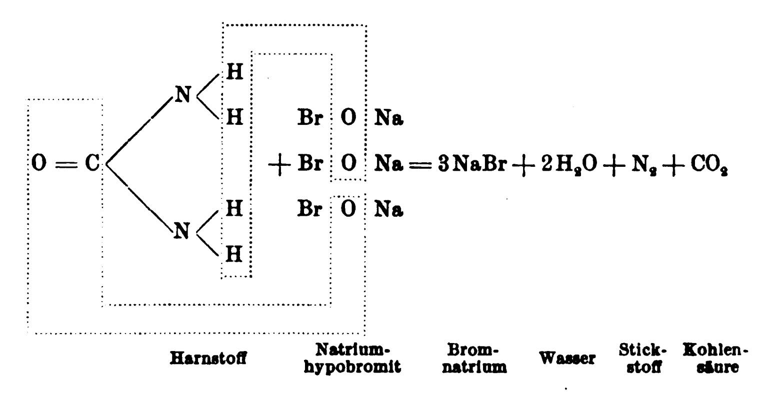
[2]) Zerschneidet man entsprechend große Fläschchen in zwei Teile, so entsteht dieses Gefäß.

[3]) Nach Angaben von Professor E. Spehl in Brüssel werden dazu 20 ccm Brom und 60 g NaOH zu 1 l Wasser gelöst.

die Schale in die Hypobromitlösung zu setzen, ohne daß eine Mischung der beiden Flüssigkeiten stattfinden kann. Diese Schale muß aus dickem Glas hergestellt sein und mindestens 10 g wiegen, um zu verhindern, daß sie in der Hypobromitlösung umherschwankt oder umkippt. Die untere Seite dieser Schale ist der größeren Standfestigkeit wegen leicht konkav gewölbt.

Der Rand des Gefäßes ist abgeschliffen und mit Vaselin eingeschmiert. Dieser erste Teil des Ureometers dient dem Entweichen des Stickstoffs.

Bekanntlich reagiert das Natriumhypobromit mit Harnstoff derart, daß es Stickstoff und Kohlendioxyd (Kohlensäure) freimacht nach der Formel:



Die Hypobromitlösung erhält einen gewissen Überschuß vom Natriumhydrat, welch letzteres die entstehende Kohlensäure bindet. Infolgedessen wird der Stickstoff für sich allein ausgeschieden; er entweicht aus der Lösung und vermischt sich mit der atmosphärischen Luft.

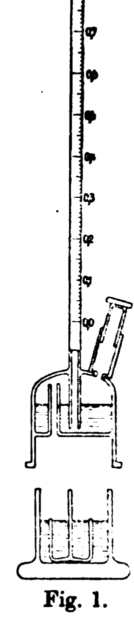
Das Prinzip aller Harnstoffmesser mittels Hypobromit besteht nun darin, den in Freiheit gesetzten Stickstoff so aufzufangen, daß man dessen Volumen so genau wie möglich feststellen kann, um dann daraus die Menge des Harnstoffs zu bestimmen, die in der zu analysierenden Lösung vorhanden ist[1]).

Der zweite Teil unseres Apparates hat denn auch keinen

---

[1]) Denn für klinische Untersuchungen darf man die Gegenwart des Kreatinins, des Tyrosins, der Harnsäure usw. nicht außer acht lassen (P. Spehl).

anderen Zweck. Er besteht aus einem kleinen Glasreservoir, das 25 ccm Wasser[1]) und 15 ccm Luft enthält. An seiner Basis befindet sich ein gläserner Ring, dessen innere Fläche geschliffen und mit Vaselin eingefettet ist und der auf die äußere, ebenfalls geschliffene und mit Vaselin bestrichene Öffnung des Gefäßes genau und hermetisch paßt. Der äußere Durchmesser dieses Ringes beträgt 5 cm und ist ungefähr gleich dem des Reservoirs. Die Höhe des Ringes mißt 2 cm und die des Wasserreservoirs, vom Boden bis zur Decke, $3\,^1/_2$ bis 4 cm. Wenn dieser Wasserbehälter auf dem Gefäße angebracht ist, schließt er außer den zwei Lösungen des Harnstoffes und des Hypobromits eine gewisse Menge Luft ab, die man auf 25 ccm schätzen kann. Diese Luft steht in Verbindung mit der 15 ccm messenden Luft des Wasserreservoirs mittels einer kleinen, 3 cm langen Glasröhre, deren untere Öffnung an dem Boden des Wasserbehälters, der an dieser Stelle durchlocht ist, angelötet und von der Decke des Reservoirs 3 mm entfernt ist. Dieses Rohr steht vertikal 1 cm außerhalb der Achse des Behälters.


Fig. 1.

Im Mittelpunkt durchschneidet die Decke des Wasserbehälters eine weitere Glasröhre von 35 cm Länge und 3 mm innerem Durchmesser, und zwar $3\,^1/_2$ cm oberhalb ihrer unteren Öffnung. Ihre untere Öffnung taucht frei 2 mm vom Boden in das Wasser des Reservoirs ein und ist luftdicht an die Decke angelötet. 3 cm höher befindet sich der Nullpunkt der Skala der Glasröhre; die Gradeinteilung selbst ist mit der Maschine hergestellt und endet mit dem Grad $1\,^0/_{00}$ auf 25 cm Höhe. Wieder 3 cm höher befindet sich die obere Öffnung der Röhre, an die ein 5 cm hohes und 12 mm breites zylindrisches Gefäß angelötet ist. Dieses Gefäß soll die Messung jener Harnstofflösungen erlauben, die an Gehalt die gewöhnlichen Werte

[1]) Dem etwas Sublimat im Verhältnis $1\,^0/_{00}$ beigegeben ist, um im Inneren des Reservoirs Algen- oder Schimmelentwicklung zu verhindern.

übersteigen[1]). Die genannte Glasröhre ist kalibriert und mit einer Skala versehen, die vom Nullpunkt bis zum höchsten Grade (1 °/₀₀) in hundert gleiche Teile geteilt ist. Diese hundertteiligen Abstufungen sind $2^1/_2$ mm voneinander entfernt und in Abständen von $^1/_{10}$ numeriert, wie folgt:

0,0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0,

die den Satz per Tausend darstellen.

Diese Ziffern ergaben sich auch beim Gebrauch unseres Apparates für Test-Harnstofflösungen, woraus hervorgeht, daß diese Zahlen den Gehalt pro Mille der analysierten Harnstofflösung darstellen. Aus Vorstehendem ergibt sich, daß die Ablesung der graduierten Tube nicht nur von einem hundertsten Grade zum anderen, d. h. auf ein Hundertstel pro Mille möglich ist, sondern sogar, da $2^1/_2$ mm zwischen zwei Gradeinschnitten liegen, mindestens auf die Hälfte dieses Wertes, d. h. auf 0,005 °/₀₀; und da außerdem die vom Apparat geforderte Menge Harnstofflösung 10 cm beträgt, also 100 mal geringer ist als 1000 ccm, erlaubt die Skala unserer Tube die Ablesung einer ausgeschiedenen Stickstoffmenge, die einem Wert von $\frac{0{,}005 \text{ g}}{100}$ Harnstoff entspricht, gleich 0,00005 g, also fünf Hundertstel eines Milligramms, gleich $^1/_{20}$ mg Harnstoff. Damit gewinnen wir ein Bild von der Genauigkeit dieses Ureometers.

Um die Ausscheidungsmenge des Stickstoffs genau zu ermitteln, ist es selbstverständlich erforderlich, daß das Wasser, das in die mit der Skala versehene Röhre unter dem Drucke des freigewordenen, sich mit der Luft im Apparat vermischenden Stickstoffs steigt, genau vom Nullpunkt ausgeht. Zu diesem Zweck befindet sich auf gleicher Höhe mit der Decke des Wasserbehälters, seitlich von der graduierten Tube, ein kleiner Zylinder aus Kupfer, der hohl, $2^1/_2$ cm hoch, außen $1^1/_2$ cm

---

[1]) Wenn unter dem Einflusse der Stickstoffentwicklung das Wasser des Behälters bis in dieses Expansionsgefäß steigt, so genügt es, es mit einer Pasteur-Pipette (ausgezogene Röhre) bis zum Teilstrich 1 °/₀₀ aufzusaugen, die Schraube abzudrehen, um das Wasserniveau bis zum Nullpunkt der Skala fallen zu lassen und sodann das Wasser der Pipette in die Expansionsröhre wieder einzulassen. Manchmal bleibt etwas Luft in der graduierten Röhre; man kann sie aber mit der Pipette auffangen. Der wirkliche Prozentsatz ist dann 1 °/₀₀ plus der Zahl pro Mille, die man nach dem Zurückfließen des Wassers erhält.

breit ist, und dessen Innenraum durch eine Öffnung mit der Luft des Reservoirs in Verbindung steht[1]). Die innere Fläche dieses Zylinders zeigt eine Schraubenwindung von 1 mm per Umdrehung, wodurch eine mit Vaselin überstrichene und mit Kopf versehene Schraube in den Zylinder eingeführt werden kann, um mit der nötigen Genauigkeit auf die Luft im Apparat einen Druck auszuüben und auf diese Weise das Wasser des Behälters bis zum Nullpunkt der Skala zurückzudrängen. So eingestellt, schließt das Ureometer Luft ein, deren Druck dem der Atmosphäre gleich ist, vermehrt um eine leichte Pression von 6 cm Wasserhöhe, gleich 5 mm Quecksilberhöhe. Diese ist den täglichen atmosphärischen Druckveränderungen vergleichbar und kann infolge ihrer Geringfügigkeit außer acht gelassen werden. Da die Einteilung der Skala nach einer Testlösung hergestellt worden ist, so kann ein Irrtum als ausgeschlossen gelten. Der Luftdruck im Apparat hängt aber auch von der Umgebungstemperatur ab, die zwischen 15 und 18° ohne Schaden schwanken kann. Deshalb nimmt man im Falle einer besonders genauen Messung, wie man sie in den Laboratorien zum Zwecke wissenschaftlicher Forschungen zu machen wünscht, eine zweite Analyse mittels einer Testlösung vor und berechnet dann nach der Regeldetri die Fehler, die durch atmosphärische Druck- und Temperaturschwankungen bedingt sein könnten. Ich wiederhole jedoch, daß diese Schwankungen, die sich auf einige Tausendstel pro Mille berechnen lassen, in der klinischen Biologie in Anbetracht ihrer minimalen Bedeutung vernachlässigt werden können.

Damit ist unser Ureometer vollständig gebrauchsfertig. Man wartet erst einige Augenblicke ab, um festzustellen, ob der Meniskus am Nullpunkt der Glasröhre stehen bleibt, und ob nicht irgendein Entweichen stattfindet[2]).

Dann faßt man den Apparat mit dem Daumen und Zeigefinger der linken Hand seitlich am Gefäß an, um ihn in die rechte Hand zu stellen, die ihn festhält, und zwar am Fuße, um eine Temperaturerhöhung durch Berührung mit den Fingern zu ver-

[1]) Das Kupfergefäß ist mittels Guttapercha an das Glas befestigt.

[2]) Es ist unnötig und selbst schädlich, den Glasring zu fest auf die Öffnung des Gefäßes zu schrauben; man würde Gefahr laufen, diesen Ring zu beschädigen.

meiden. Mit dem freigewordenen Daumen und Zeigefinger der linken Hand hält man den Apparat in der Mitte der graduierten Glasröhre aufrecht. Der metallene Zylinder ist gegen das Fenster gerichtet, dem gegenüber man operiert. Hierauf neigt man den Apparat um 45° und beobachtet, was im Wasserbehälter vor sich geht, denn der Wasserspiegel darf weder die Öffnung der Verbindungsröhre zwischen dem Gefäß und dem Wasserbehälter, noch die untere Öffnung der graduierten Röhre übersteigen.

Während dieser Neigung des Apparates vermischt sich das Natriumhyperbromit mit der Harnstofflösung, wonach man den Apparat wieder aufrichtet. Erst dann versetzt man dem Fuße des Apparates kleine Seitenbewegungen von 1 cm Weite, um die Mischung der beiden Lösungen zu erleichtern. Vermöge der Bewegungsfähigkeit der Glasschale, die gleichzeitig als Mischgefäß dient, genügen diese kleinen seitlichen Schwingungen vollauf, um ein gutes Vermischen zu erzielen. Andererseits darf die Ausdehnung dieser Bewegungen kaum größer sein, denn sonst würde das Wasser des Reservoirs zu stark geschüttelt werden und in die graduierte Röhre eintreten, wobei ein Entweichen von Gas stattfinden und die Analyse fehlerhaft werden könnte. Wenn man dann aufhört, das Gefäß zu schütteln, findet man, daß das Wasser in der mit Skala versehenen Röhre über den Nullpunkt gestiegen ist. Hierauf neigt und schüttelt man den Apparat unter wiederholter Ablesung so lange, bis man sich überzeugt hat, daß eine weiteres Steigen des Wassers in der graduierten Glasröhre nicht mehr eintritt. Gewöhnlich geschieht dies nach fünf derartigen Operationen. Sodann kann man die Zahl ablesen, die den Gehalt der analysierten Lösung an Harnstoff pro Mille darstellt.

Diese Gradeinteilung wurde durch Versuche mit Harnstoff-Testlösungen zu

0,1 ‰, 0,2 ‰, 0,3 ‰, 0,4 ‰, 0,5 ‰, 0,6 ‰, 0,7 ‰,
0,8 ‰, 0,9 ‰ und 1,0 ‰

erhalten, und meine Überraschung war groß, als ich konstatierte, daß der Zwischenraum zwischen zwei benachbarten Dezimalen am oberen Teile der Skala ebenso groß war wie am unteren.

Da der ausgeschiedene Stickstoff im ersten Falle eine beträchtlichere Wassersäule zu tragen hat, war die Vermutung

nicht unbegründet, daß diese Zwischenräume am oberen Teile der Skala kleiner sind. Das Experiment hat jedoch gezeigt, daß dem nicht so ist. Wir erklären uns diese Tatsache dadurch, daß die chemische Reaktion um so lebhafter wird und die Zahl der dadurch freigemachten Calorien um so größer ist, je mehr Harnstoff die Lösung enthält. Diese Calorien erhitzen die beiden Lösungen um so mehr, und der Stickstoff entwickelt sich entsprechend leichter[1]). Um kurz zusammenzufassen: Je stärker die Harnstofflösung ist, desto mehr wird die Stickstoffentwicklung durch die Wassersäule beeinträchtigt und durch die freigewordene Energie gefördert. Diese beiden diametralen Wirkungen treten glücklicherweise für den Gehalt von 0 bis $1\,^0/_{00}$ in gleicher Stärke auf und heben sich folglich dadurch auf. Das ist meine Erklärung für die wirklich beobachtete Tatsache.

2. Quantitative Bestimmung des im Urin enthaltenen Harnstoffs.

Wir haben berechnet, daß unser Harnstoffmesser mindestens 100mal genauer ist als der Depaires. Nichts steht also im Wege, den Harn zu einer Bestimmung auf das 20fache zu verdünnen; wir haben sogar dann noch den Vorteil, im Vergleich 5mal genauer zu sein. Streben wir nur gleiche Präzision mit Depaire an, so könnte man den Urin selbst 100fach verdünnen.

Dem Gesagten zufolge saugt man zur Messung des im Harn enthaltenen Harnstoffs mittels einer graduierten Pipette $^1/_2$ ccm Urin auf und verdünnt diesen mit Wasser auf 10 ccm. Diese 10 ccm werden in die erwähnte Glasschale gegossen, worauf man das Ureometer zusammensetzt und die chemische Reaktion bewirkt. Die durch das Steigen des Wassers in der graduierten Röhre erhaltene Zahl stellt $^1/_{20}$ pro Mille des wirklichen Gehaltes des Harnstoffs im Urin dar, da letzterer 20mal verdünnt wurde; man braucht also nur die abgelesene

---

[1]) Grigaux hat dargelegt, daß, je konzentrierter eine Harnstofflösung ist, sich um so mehr Stickstoff entwickelt, und um so mehr dieser die berechnete, der schwächeren Lösung entsprechende Quantität übersteigt; mit anderen Worten, wenn $0{,}2\,^0/_{00}$ Harnstoff eine Stickstoffentwicklung von 1 ccm ergibt, dann ergibt $0{,}4\,^0/_{00}$ Harnstoff eine Stickstoffentwicklung von $1 \text{ ccm} \times 2 + n$, und Harnstoff von $0{,}6\,^0/_{00}$ ergibt eine Stickstoffmenge von $1 \text{ ccm} \times 3 + n + m$, usw.

Zahl mit 20 zu multiplizieren, um die Gesamtmenge des Stickstoffs pro Mille, auf Harnstoff berechnet, zu erhalten.

Da also $^1/_2$ ccm Urin genügt, haben wir unsere Bestimmung mit 10 Tropfen dieser Flüssigkeit vorgenommen. Wir könnten sie selbst mit 2 Tropfen, in 10 ccm Wasser verdünnt, bewerkstelligen und das erhaltene Resultat mit 100 multiplizieren, um den Gehalt pro Mille des analysierten Harns zu bekommen. Unsere im Laboratorium des St.-Petrus-Spitals in Brüssel gemachten Analysen haben uns gezeigt, daß wir unter diesen Bedingungen noch eine größere Genauigkeit als mit dem allgemein benutzten Depaireschen Apparat erhalten. Dies ist jedoch nicht etwa im Sinne einer tadelnden Kritik gemeint, sondern wir wollen nur einen Vergleichspunkt mit diesem nützlichen Apparat feststellen.

Bevor wir das Kapitel der Harnstoffbestimmung im Urin schließen, ist es in klinischer Hinsicht zweckmäßig, die Gewichtsverhältnisse des Harnstoffs, des Stickstoffs und des Eiweißes anzugeben.

Die chemische Gleichung auf S. 356 ergibt, daß 1 Molekül Harnstoff (OCN_2H_4) unter dem Einfluß des Natriumhypobromits 1 Molekül Stickstoff (N_2) entwickelt; nun betragen die Atomgewichte der Elemente: $O = 16$, $C = 12$, $N = 14$, $H = 1$; also ist das Molekulargewicht des Harnstoffs $16 + 12 + 14 \times 2 + 4 = 60$ und das des Stickstoffs $14 \times 2 = 28$. Daraus folgt, daß 60 g Harnstoff 28 g Stickstoff ergeben, und daß 1 g Harnstoff $^{28}/_{60}$ oder $^{14}/_{30}$ oder 0,466 ... g Stickstoff entspricht.

Robin hat, in diesem Sinne verfahrend, berechnet, daß 1 g Stickstoff 6,06 g Eiweiß entspricht, woraus sich ergibt, daß 0,466 ... g Stickstoff (das Äquivalent von 1 g Harnstoff) $6{,}06 \times 0{,}4666 \ldots = 2{,}827\,596$ g Eiweiß = 3 g Eiweiß entsprechen.

Kurz: 1 g Harnstoff liefert 0,4666 g Stickstoff = $^1/_2$ g und entsteht aus 3 g Eiweiß.

Da unser Ureometer die Gesamtmenge des Stickstoffs pro Mille, auf Harnstoff berechnet, anzeigt, und man die Harnausscheidungsmenge innerhalb 24 Stunden kennt, kann man die Gesamtausscheidung von Stickstoff innerhalb 24 Stunden, durch die entsprechende Menge Harnstoff ausgedrückt, ermitteln. Diese Endzahl, mit 3 multipliziert, ergibt die Eiweißmenge, die der Ernährung innerhalb 24 Stunden entspricht, woraus sich

wiederum die notwendige Nahrungsaufnahme, die natürlich infolge der unvollständigen Verdauung größer sein muß, ableiten läßt.

8. Messung des Harnstoffs im Blutserum.

Wenn man mit einer Kautschukbinde einen Arm in der Mitte abbindet, kann man sehr leicht mittels einer Hohlnadel aus einer der Adern an der Innenseite des Ellbogens 10 bis 15 ccm Blut entnehmen und in einer sterilisierten Glasröhre auffangen. Läßt man diese ruhig stehen, so bildet sich ein Koagulum. Letzteres wird nach $^1/_2$ Stunde mittels einer Pipette entfernt, worauf die Röhre 24 Stunden in ruhiger Lage verbringen muß, und zwar vorzugsweise an einem kalten Ort. Am folgenden Tage ist dann das Gerinnsel bedeutend dicker geworden und trennt sich von einem klaren, durchsichtigen Serum. Man gießt dasselbe in ein graduiertes Gefäß ab und fügt eine gleiche Menge 20%ige Trichloressigsäure oder 10%ige Phosphorwolframsäure hinzu[1]).

Die erste Säure fällt alle Eiweißstoffe, aber nicht den Harnstoff und die Zwischenprodukte wie das Kreatinin, das Tyrosin, die Harnsäure usw. Daraus folgt, daß wir mittels der Trichloressigsäure die Stickstoffmenge erhalten, die dem „Gesamtstickstoff" der Ausscheidung und nicht dem Stickstoff des Harnstoffs allein entspricht.

Die zweite Säure dagegen fällt nicht nur alle Eiweißstoffe, sondern auch die Zwischenprodukte wie das Kreatinin, das Tyrosin, die Harnsäure usw.; der Harnstoff dagegen fällt durch sie nicht aus. Mit der Phosphorwolframsäuremethode erhalten wir folglich einen Stickstoffwert, der nicht mehr verschiedenen Verbindungen entspricht, sondern der Harnstoffmenge allein.

Diesen Betrachtungen schließt sich noch eine andere an: Wenn man das Blutserum mit der gleichen Menge Säure verdünnt, so ist die Harnstofflösung im Serum ebenfalls halb verdünnt, und man muß diesem Umstande beim Ablesen der erhaltenen Resultate Rechnung tragen, d. h. man muß diese Resultate mit 2 multiplizieren, um den wirklichen Gehalt des Serums an Harnstoff zu erhalten.

---

[1]) Prof. Slosse gibt folgende Zusammensetzung an:
Phosphorwolframsäure (Merck) in 10%iger Lösung . . . . . 900 ccm,
30%ige Schwefelsäure . . . . 100 ccm.

Greifen wir jedoch auf die Technik zurück: In dem graduierten Gefäß, wo das Vermischen des Serums mit der gleichen Menge der wirkenden Säure stattfindet, entsteht ein reichlicher Niederschlag, der weiß ausfällt, wenn das Serum rein war, und bräunlich, wenn es Hämoglobin enthielt. Man filtriert mittels eines einfachen Papierfilters, das so klein wie möglich und auf einen Trichter von höchstens 4 bis 5 cm Öffnung gestülpt ist. Wenn man 10 ccm Filtrat erhält, gießt man sie in die Glasschale; wenn nicht, dann begnügt man sich mit 5 ccm, denen man 5 ccm Wasser beifügt, um sie auf 10 ccm zu bringen, und gießt dann in die Glasschale[1]).

Es ist selbstverständlich, daß, wenn man auf diese Weise das Filtrat auf die Hälfte verdünnt, die auf der graduierten Röhre abzulesende Zahl nicht mit 2, sondern mit 4 multipliziert werden muß.

Wenn man die Phosphorwolframsäuremethode anwendet, fügt man zweckmäßig dem Filtrat eine gleiche Menge 10⁰/₀ige wässerige Natriumhydratlösung hinzu. Doch muß man auf jeden Fall bei dieser Methode die erhaltene Zahl mit 4 multiplizieren[2]).

Seit einiger Zeit nehmen wir derartige Messungen im St.-Petrus-Spital an Kranken in der medizinischen Abteilung vor. Als wir zuerst die Trichloressigsäure benutzten, haben wir in urämischen Komafällen bis $4^0/_{00}$ Harnstoffäquivalent im Serum erhalten. Ich muß jedoch hinzufügen, daß dieser so hohe Wert nicht allein dem Harnstoff im Serum entspricht, sondern diesem Harnstoff, vermehrt um Kreatin-, Tyrosin- und andere Basen, deren Vorkommen im Serum dieser Art von Kranken bereits nachgewiesen wurde. Und tatsächlich ergab die Bestimmung mit Phosphorwolframsäure eine beträchtlich kleinere Zahl.

Klinisch ist diese Beobachtung von Bedeutung, denn sie gewährt uns vielleicht die Möglichkeit, die Ausscheidungstätigkeit der Leber zahlenmäßig zu kontrollieren und zu bestimmen.

---

[1]) Damit das Gesamtvolumen der im Apparat enthaltenen Luft immer das gleiche ist, muß auch die zu analysierende Harnstofflösung immer dasselbe Volumen haben, d. h. 10 ccm.

[2]) Bei der Anwendung der Trichloressigsäure ist ein Hinzufügen von Natriumhydrat nicht nötig; denn wir haben mit Dr. Nouille konstatieren können, daß die Mischung der Harnstoff- nnd Hypobromitlösung nach der chemischen Reaktion stark alkalisch bleibt (Prüfung mit Lackmuspapier).

Es steht bekanntlich fest, daß die Anhäufung dieser intermediären Produkte wie Kreatinin, Tyrosin, Harnsäure usw. im Blut gerade infolge schlechter Lebertätigkeit stattfindet. Wir kommen auf diese wichtige Frage später noch zurück.

4. Bestimmung des Harnstoffs der Cerebrospinalflüssigkeit.

Diese Flüssigkeit wird mittels des Troicart Tuffiers und nicht mit der Hohlnadel aufgefangen. Man behandelt sie wie das Serum, das man durch Gerinnung des Blutes erhielt.

5. Formel von Ambard und Größe der Nierentätigkeit.

Ambard und Moreno veröffentlichten im Jahre 1911 in der „Presse médicale de Paris" ihre bemerkenswerte Arbeit: „Mesure de l'Activité rénale par l'étude comparée de l'urée dans le sang et de l'urée dans l'urine".

Ambard hat experimentell — und zwar dadurch, daß er von mehreren, verschiedenen Personen Harnstoff einnehmen ließ und dann die Messung desselben im Blut und im Harn vornahm — gezeigt, daß die Ausscheidung von Harnstoff (D) im direkten Verhältnis zum Quadrat seiner Konzentration im Blut steht (Ur),

$$\text{also } \frac{D}{D'} = \frac{Ur^2}{Ur'^2}, \text{ daraus } \frac{\sqrt{D}}{\sqrt{D'}} = \frac{Ur}{Ur'}$$

oder

$$\frac{Ur}{\sqrt{D}} = \frac{Ur'}{\sqrt{D'}} = \ldots \frac{Ur''}{\sqrt{D''}} = \text{eine Konstante } K,$$

also

$$K = \frac{Ur}{\sqrt{D}} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (1)$$

Diese Gleichung (1) stellt die Ambardsche Formel in ihrer einfachsten Form dar. Diese Konstante ist jedoch noch zwei Einflüssen unterworfen, erstens dem des Gewichts der betreffenden Person und zweitens dem des Konzentrationsgrades des Harnstoffs im Urin. Es ist auch ganz natürlich, daß ein Versuchsobjekt von 50 kg eine 50 mal größere Ausscheidung von Harnstoff hat, als eins von nur 1 kg Gewicht. Man muß sie also auf ein mittleres Gewicht (das gleiche gilt für alle Formeln), sagen wir auf 70 kg, zurückführen, um die Formeln untereinander vergleichen und den Wert des Einflusses, den das Gewicht der betreffenden Person auf die Berechnung ausübt, feststellen zu können. Dies kann in folgender Weise vorgenommen werden:

Wenn eine Person von P kg D g in 24 Stunden ausscheidet, so ergibt eine Person von 1 kg $\frac{D}{P}$ g in 24 Stunden und von 70 kg $\frac{D \times 70}{P}$ g in 24 Stunden.

Der Einfluß des Gewichts oder dieser Verbesserungskoeffizient der Formel ist also

$$\frac{70}{P} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (2)$$

Fürs zweite hat Ambard, indem er Wasser und Harnstoff an mehrere Personen verabreichte und dann den Harnstoff im Blut und im Urin bestimmte, klargelegt, daß die Harnstoffausscheidung im umgekehrten Verhältnis zur Quadratwurzel der Harnstoffkonzentration im Urin steht (c). Also

$$\frac{D}{D'} = \frac{\sqrt{c'}}{\sqrt{c}}.$$

Und wenn man für c das konventionelle Mittel von 25 $^0/_{00}$ annimmt, kann man den zweiten Verbesserungskoeffizienten unserer Formel, der von c abhängt, folgenderweise aufstellen:

Wenn die Konzentration c beträgt, so ist die Ausscheidung D, wenn die Konzentration 1 beträgt, so ist die Auscheidung umgekehrt proportional zur Quadratwurzel, also $D \times \sqrt{c}$, und wenn die Konzentration 25 beträgt, so ist die Ausscheidung $D \times \frac{\sqrt{c}}{\sqrt{25}}$.

Demnach beträgt der von der Harstoffkonzentration im Urin abhängige Verbesserungskoeffizient

$$\frac{\sqrt{c}}{\sqrt{25}} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (3)$$

Wenn man nun in die Formel (1) diese zwei Verbesserungskoeffizienten (2) und (3) einsetzt, so erhält man

$$K = \frac{Ur}{\sqrt{D \times \frac{70}{50} \times \frac{\sqrt{c}}{\sqrt{25}}}}.$$

Die Größe der Nierentätigkeit stellt man nun auf folgende Weise fest:

Aus der Formel (1) $K = \frac{Ur}{\sqrt{D}}$ schaltet man den Wert D aus, indem man die Gleichung ins Quadrat erhebt:

$$K^2 = \frac{Ur^2}{D},$$

daraus

$$D = \frac{Ur^2}{K^2} \quad \ldots \ldots \ldots \ldots \quad (5)$$

Es hat also bei derselben Harnstoffkonzentration Ur eine gesunde Person, deren Konstante K gleich 0,065 gefunden worden ist, eine Auscheidung von $\frac{Ur^2}{K^2} = \frac{Ur^2}{0,004\,225}$; und eine kranke Person, deren Konstante K' ist, eine Ausscheidung von $\frac{Ur}{K'^2}$; daraus folgt, daß wenn die

Ausscheidung $\frac{Ur^2}{0{,}004\,225}$ beträgt (d. h. die einer gesunden Person), so ist die Nierentätigkeit

$$\text{gleich } 100\,\%,$$

wenn die Ausscheidung 1 beträgt (d. h. die einer kranken Person), so ist diese Größe:

$$\frac{100}{\frac{Ur^2}{0{,}004\,225}}\,\%,$$

wenn die Ausscheidung $\frac{Ur}{K'^2}$ beträgt (d. h. die eines Kranken, dessen Harnstoffkonstante K' ist):

$$\frac{100 \times \frac{Ur^2}{K'^2}}{\frac{Ur}{0{,}004\,225}}\,\%$$

gleich:

$$\frac{0{,}4225}{K'^2}\,\% \quad \ldots\ldots\ldots\ldots \quad (6)$$

Es genügt, von diesen Berechnungen die Resultate, d. h. die Formeln (4) und (6) sich zu merken, die bei dem Schema, das nur zur Analyse im Krankenhauslaboratorium dient, in Anwendung kommen.

Dieses Schema stammt von Chevassu; ich habe noch die Berechnungen bezüglich der Nierentätigkeit hinzugefügt.

Man könnte der Ambardschen Formel den Vorwurf der Ungenauigkeit machen, die durch die Art der Urinsammlung bedingt wird. Wenn man nämlich die Blase durch einfaches Harnlassen, ohne Katheter entleeren will, so ist man nicht sicher, den ganzen Urin erhalten zu haben; und andererseits kann es bei Anwendung des Katheters vorkommen, daß durch Reflexwirkung die Harnausscheidung behindert wird. Um diese Schwierigkeit zu überwinden, katherisiert man, und sammelt erst am folgenden Tage — der Kranke bleibt ja demselben Regime unterworfen — die Gesamtmenge des Urins von 24 Stunden. Diese wird gemessen und ihr Gehalt an Harnstoff berechnet. Die Erfahrung hat uns gelehrt, daß dies ein vorzügliches Kontrollmittel ist und daß der Fehler, den man der Harnsammlung und der Reflexwirkung auf die Ausscheidung zuschieben kann, die Werte für die Nierentätigkeit nur im allgemeinen um 1 bis 3 % ungenau macht. Diese Ungenauigkeit in der Bestimmung der Größe der Nierentätigkeit kann praktisch, besonders in der Nierenchirurgie, vernachlässigt werden, zweifellos kommt es nicht auf 3 % der Nierentätigkeit an, um eine Nephroctomie rechtfertigen zu können.

6. Größe der Ausscheidungstätigkeit der Leber.

Je träger die Leber arbeitet, desto größer ist das Verhältnis zwischen den Kreatin- und anderen Basen einerseits und dem Harnstoff andererseits. Wenn wir dieses Verhältnis R nennen und es bei einer gesunden Person bestimmen, erhalten wir ein Minimum, dessen Wert in dem Maße zunimmt, als die Leberfunktion verlangsamt ist. Man könnte daran denken, die Formel für eine „Leberkonstante" aufzustellen, die den Überschuß an Kreatinin im Blutserum, das Vorhandensein des Harnstoffs im Serum und das Gewicht der Person ausdrücken würde.

Daraus würde man dann die Größe der Lebertätigkeit berechnen. Dieser letztere Gedanke ist aber noch reine Theorie, die jedoch, wie ich hoffe, ihre praktische Anwendung in der klinischen Biologie bald finden wird.

Einstweilen begnügen wir uns damit, den vom Serum — das mit Trichloressigsäure und dann mit Natriumhypobromit behandelt wurde — gelieferten Gesamtstickstoff, als Harnstoff berechnet, zu messen und daraus den Harnstoff des zuerst mit der Phosphorwolframsäure, dann mit Natriumhydrat und endlich mit Natriumhypobromit behandelten Serums abzuleiten. Diese so erhaltene Zahl, dividiert durch den Harnstoffwert, der mittels der Phosphorwolframsäure-Methode erhalten wurde, ergibt das Verhältnis zwischen den Kreatin-, Tyrosin- und anderen Basen einerseits, und dem daraus entstehenden Harnstoff andererseits. Dieses Verhältnis gibt uns in klinischer Hinsicht schon einen genügend klaren Begriff über die Ausscheidung durch die Leber.

Ich hoffe, später die auf diesem neuen Wege erhaltenen Resultate mitteilen zu können.

7. Schluß.

Dieses Ureometer ermöglicht eine genaue Messung des Harnstoffs mit 10 Tropfen oder selbst nur mit 2 Tropfen Urin sowie mit 5 ccm Blutserum oder Cerebrospinalflüssigkeit; sodann gestattet es noch, in klinischer Hinsicht die Leberarbeit zahlenmäßig darzustellen, was bis jetzt nicht möglich war, jedoch von großem Interesse ist.

Proteinogene Amine.[1])

Peptamine: Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin, Alanyl-p-Oxyphenyläthylamin, Glycyl-β-Imidazolyläthylamin.

Von

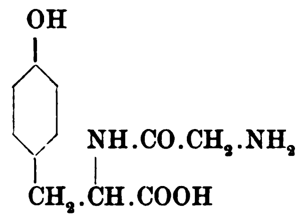
M. Guggenheim.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium von F. Hoffmann-La Roche & Co., Grenzach.)

(Eingegangen am 5. Mai 1913.)

Mit 23 Figuren im Text.

Die Bedeutung, die den proteinogenen Aminen als Zwischenprodukten des enteralen und parenteralen Eiweißstoffwechsels zukommt, ließ es von erheblichem praktischen und theoretischen Interesse erscheinen, Verbindungen zu untersuchen, die zu den höher molekularen Spaltstücken des Eiweißes, den Polypeptiden, im selben Verhältnis stehen wie die Amine — Phenyläthylamin, p-Oxyphenyläthylamin, β-Imidazolyläthylamin usw. — zu den entsprechenden Aminosäuren — Phenylalanin, Tyrosin, Histidin usw. —, die sich also von den Polypeptiden durch Verlust des endständigen Carboxyls ableiten. Aus dem Dipeptid Glycyltyrosin



[1]) Frühere Mitteilungen vgl. M. Guggenheim, „Zur Kenntnis der Wirkung des p-Oxyphenyläthylamins“, Therap. Monatsh. **26**, 1912, und „Proteinogene Amine“, ebenda **27**, 1913.

entstünde so Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin:

```
         OH
         |
        / \
       |   |
        \ /    NH.CO.CH2.NH2,
         |     |
         CH2 . CH2
```

aus Glycyl-Histidin

```
      /CH\\
    HN     N          CO.CH2.NH2
    |      |          |
    C======C—CH2.CH(NH).COOH
```

Glycyl-β-Imidazolyläthylamin

```
      /CH\\
    HN     N             CO.CH2.NH2.
    |      |             |
    HC=====C—CH2.CH2—NH
```

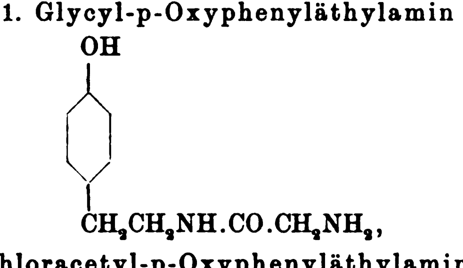
Daß solche Substanzen, in der Folge kurz als Peptamine bezeichnet, in der Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels eine Rolle spielen können, ist aus mehrfachen Gründen wahrscheinlich. Einerseits erscheint es nicht ausgeschlossen, daß dieselben biochemischen Bedingungen, welche die Aminosäuren in die Amine umwandeln, d. h. also bakterielle oder rein fermentative Prozesse, in gleicher Weise eine Umwandlung der Polypeptide in Peptamine bewirken, andererseits ist die Möglichkeit gegeben, daß sich aus den Aminen durch synthetische Prozesse Peptamine aufbauen, gleichwie aus den Aminosäuren die Bildung der Polypeptide erfolgt.

Um über die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften dieser interessanten Körperklasse Aufschluß zu erlangen, wurde die Synthese einiger Peptamine in Angriff genommen, und zwar wurden, ausgehend vom p-Oxyphenyläthylamin und β-Imidazolyläthylamin, die ihrer hervorragenden pharmakologischen Eigenschaften wegen am meisten Interesse bieten, Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin, Alanyl-p-Oxyphenyläthylamin und Glycyl-β-Imidazolyläthylamin dargestellt und in einer Reihe von orientierenden Versuchen auf ihr Verhalten im tierischen Organismus geprüft.

Beim Aufbau der Peptamine hielten wir uns eng an die von E. Fischer bei der Synthese der Polypeptide vorzugsweise verwendete Methode der Kupplung mit Halogenacylchloriden in wässerig-alkalischer Lösung und nachfolgender Amidierung mit konzentriertem wässerigem Ammoniak. Während die Kupplung eine fast theoretische Ausbeute an Halogenacylamin ergab, scheinen bei der Behandlung mit NH_3 neben dem Ersatz des Halogens durch NH_2 noch andere Reaktionen zu verlaufen, so daß die Ausbeute an Peptamin erheblich reduziert wird.

Die Peptamine sind, wie ihre chemische Konstitution erwarten ließ, Körper von ausgesprochen basischem Charakter. Ihr Verhalten steht in völliger Analogie zu dem der zugrunde liegenden Amine.

1. Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin



Chloracetyl-p-Oxyphenyläthylamin

$OH.C_6H_4CH_2CH_2.NH.CO.CH_2Cl.$

7,0 g p-Oxyphenyläthylaminchlorhydrat ($^4/_{100}$ Mol.) werden in 40 Teilen 2 n-Natronlauge (2 Äquiv.) gelöst und unter Eiskühlung portionenweise mit 5,8 g Chloracetylchlorid (1,2 Äquiv.), gelöst in ca. 20 ccm Äther, versetzt, indem man gleichzeitig äquivalente Mengen 2 n-NaOH zufügt. Nach dem Verschwinden des Chloracetylchloridgeruches säuert man mit 1 Äquiv. Salzsäure an. Ein Teil des Kupplungsproduktes scheidet sich dabei krystallinisch ab. Der Rest wird entweder direkt oder nach dem Eindampfen im Vakuum ausgeäthert. Die Ausbeute ist nahezu quantitativ.

Die Substanz bildet derbe, farblose Krystalle vom Schmelzpunkt 109°. In kaltem Wasser ist sie wenig löslich, in warmem leicht. In Alkohol und Äther ist sie sehr leicht löslich.

0,3028 g Substanz brauchten nach Kjeldahl 14,4 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

0,1762 g Substanz gaben nach Carius 0,1211 g AgCl.

Ber. für $C_{10}H_{12}O_2NCl$:	Gefunden:
Cl . . . 16,60%	17,00%
N . . . 6,56%	6,65%

Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin. Läßt man das Chloracetyl-p-Oxyphenyläthylamin 3 bis 5 Tage mit etwa der 10fachen Menge 20%igem wässerigem Ammoniak stehen, so tritt an Stelle des Chlors eine Aminogruppe. Nach dem Eindampfen hinterbleibt ein zäher Sirup. Dieser stellt ein Gemisch von Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin und Ammonchlorid dar. Daneben finden sich noch andere Reaktionsprodukte, sei es, daß durch die verseifende Wirkung das Chlor durch die Oxygruppe ersetzt wurde, sei es, daß das NH_3 unter Bildung sekundärer Basen reagiert hat. Diese Nebenprodukte wurden nicht näher studiert, sondern in folgender Weise direkt auf die Isolierung des Glycyl-p-Oxyphenyläthylamins gearbeitet. Nach vollständigem Abdampfen des Ammoniaks wird das Gemisch mit Wasser aufgenommen und von einem sirupösen, in Alkohol löslichen Sirup abfiltriert. Die wässerige Lösung wird mit frisch gefälltem Silberoxyd geschüttelt, filtriert, von Silber durch Schwefelwasserstoff befreit und im Vakuum zur Trockne gedampft. Der Rückstand wird in Alkohol gelöst und die alkoholische Lösung eingedampft. Es hinterbleibt eine krystallisierte Substanz, die durch Umkrystallisieren aus Alkohol gereinigt wird. Der Schmelzpunkt der zweimal aus Alkohol krystallisierten Substanz liegt bei 136° (unkorr.).

0,1802 g Substanz brauchten nach Kjeldahl 18,95 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

Ber. für $C_{10}H_{14}N_2O_2$ (194,1):	Gefunden:
N . . . 14,43%	14,73%

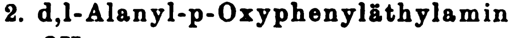
Das Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin krystallisiert in derben, zu Drusen vereinigten Nadeln. Es ist in kaltem Wasser wenig löslich, in warmem leicht löslich, scheidet sich dann aber auch aus konzentrierter Lösung nur langsam ab. Das gleiche Lösungsverhältnis besteht gegenüber Alkohol. In Äther ist es sehr wenig löslich. Das Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin gibt die Millonsche Reaktion. Es ist eine starke Base, die sich gegen Lackmus oder Methylrot titrieren läßt.

0,1740 g brauchten bei der Titration mit $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure (Indicator Methylrot) 8,7 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4, berechnet für $(C_{10}H_{14}N_2O_2)H_2SO_4$ 8,96 ccm.

Das neutrale Sulfat hinterbleibt als hygroskopische, amorphe Masse. Das Chlorhydrat krystallisiert aus Alkohol + Äther und ist sehr hygroskopisch. Mit Pikrinsäure entsteht keine Fällung, mit Phosphorwolframsäure in schwefelsaurer Lösung eine Trübung. Mit 10% wäss. $HgCl_2$ entsteht ebenfalls eine Trübung; fügt man noch Soda bis zur alkalischen Reaktion zu, so ergibt sich eine flockige Fällung.

2. d,l-Alanyl-p-Oxyphenyläthylamin

OH



—$CH_2.CH_2NH.CO.CH.(NH_2).CH_3$,

d,l-Brompropionyl-p-Oxyphenyläthylamin.

$OH.C_6H_4.CH_2.CH_2.NH.CO.CHBr.CH_3$.

8,7 g ($^{5}/_{100}$ Mol) p-Oxyphenyläthylamin werden in 50 ccm 2 n-NaOH gelöst und mit 10,2 g Brompropionylchlorid in analoger Weise wie beim Chloracetyl-p-Oxyphenyläthylamin gekuppelt. Das Brompropionyl-p-Oxyphenyläthylamin krystallisiert in derben Nadeln, Schmelzpunkt 98° (unkorr.). Es ist in Wasser sehr wenig löslich, leicht löslich in Alkohol und Äther.

0,2808 g Substanz gaben nach Carius 0,1890 g AgBr.

0,2147 g Substanz brauchten nach Kjeldahl 7,9 ccm $^{n}/_{10}$-H_2SO_4.

Ber. für $C_{11}H_{14}O_2NBr$ (272,0):		Gefunden:
Br	29,55%	28,64%
N	5,18%	5,16%

d,l-Alanyl-p-Oxyphenyläthylamin.

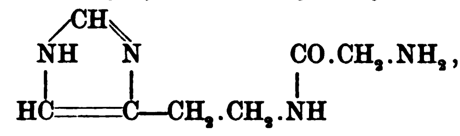
Das mit konz. wäss. Ammoniak erhaltene Amidierungsprodukt aus 10 g Bromkörper wurde nach derselben, beim Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die freie Base hinterblieb schließlich als gelblich gefärbter zähflüssiger Sirup, der nach mehrtägigem Stehen über konz. H_2SO_4 zu einer strahlig krystallisierenden Masse erstarrte. Diese wurde mit absolutem Alkohol zerrieben und von harzigen

Beimengungen befreit. Es hinterblieb eine geringe Menge einer in Nädelchen krystallisierten Substanz. Diese zeigte nach dem Umkrystallisieren aus Alkohol den Schmelzpunkt 116°.

0,1750 g verbrauchten 16,45 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

Ber. für $C_{11}.H_{16}.O_2N_2$ (208):	Gefunden:
N 13,46%	13,17%

3. Glycyl-β-Imidazolyläthylamin



Chloracetyl-β-Imidazolyläthylamin

$C_3H_3N_2.CH_2.CH_2.NH.CO.CH_2.Cl$

5,5 g β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat wurden mit 30 ccm 2 n-Natronlauge versetzt und dazu 4,23 g Chloracetylchlorid in 25 ccm Äther gleichzeitig mit 80 ccm 2 n-Natronlauge portionenweise hinzugefügt. Nach der Neutralisation mit 15 ccm 2 n-HCl wird die Ätherschicht abgetrennt und die wässerige Lösung im Vakuum zur Trockne gedampft. Es hinterbleibt eine zähe, farblose Masse. Diese ist leicht löslich in absolutem Alkohol und aus der absolut alkoholischen Lösung mit Äther als Sirup abscheidbar. Sie wurde nicht weiter analysiert, sondern direkt auf Glycyl-β-Imidazolyläthylamin verarbeitet.

Glycyl-β-Imidazolyläthylamin.

Die Amidierung erfolgte in üblicher Weise mit der 10fachen Menge 20%igem wässerigem Ammoniak. Der Rückstand der Amidierungsflüssigkeit ist ein krystallisiertes Gemisch von Ammonchlorid und Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorid. Zur Trennung wurde es in schwefelsaurer Lösung mit Silbersulfat behandelt und nachher vom Silber und von der Schwefelsäure in üblicher Weise befreit. Das Glycyl-β-Imidazolyläthylamin hinterbleibt als schwach gelblich gefärbte sirupöse, stark alkalische Masse, die leicht löslich ist in Alkohol, wenig löslich in Äther. Der Sirup wurde in absolutem Alkohol gelöst und mit absolutalkoholischer Salzsäure neutralisiert. Es scheidet sich sofort in reichlichen Mengen das Dichlorhydrat des Glycyl-β-Imidazolyläthylamins ab. Dieses ist leicht löslich in Wasser, wenig lös-

lich in kaltem, ziemlich löslich in heißem Alkohol. Aus Alkohol umkrystallisiert, schmilzt es unter Zersetzung bei 250° (unkorr.).

0,1955 g brauchten nach Kjeldahl 31,65 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4.

0,1854 g brauchten 14,7 ccm $^n/_{10}$-$AgNO_3$.

Ber. für $C_7H_{14}ON_4Cl_2$ (241,07):	Gefunden:
N . . . 23,24%	22,68%
Cl . . . 29,42%	28,11%

Zur Darstellung des Goldsalzes des Glycyl-β-Imidazolyläthylamins wurden 0,2 g Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat in Alkohol gelöst, mit 2 ccm 10%iger wässeriger Goldchloridlösung versetzt und im Exsiccator zur Trockne gedunstet. Das in derben orangefarbenen Drusen sich abscheidende Goldsalz wurde mit Wasser gewaschen. Es schmilzt unter Zersetzung gegen 215° (unkorr.).

0,0972 g gaben 0,0452 g Au.

Ber. für $C_7H_{18}N_4OCl_8Au_2$:	Gefunden:
Au 46,57%	46,50%

Mit wässeriger Pikrinsäure scheidet sich ein öliges Pikrat aus, das allmählich zu derben Krystallen erstarrt. Diese sintern bei 195° (unkorr.) und schmelzen bei 211 bis 212° (unkorr.) unter Zersetzung. Mit Paulys Reagens zeigt sich die für Imidazolderivate charakteristische Rotfärbung. Mit sodaalkalischer Sublimatlösung erfolgte eine flockige, voluminöse Fällung.

Beim Kochen mit konzentrierter Salzsäure wird das Glycyl-β-Imidazolyläthylamin gespalten. Nach dem Verjagen der Salzsäure läßt sich β-Imidazolyläthylamin in Form des charakteristischen, schwer löslichen Pikrats (Schmelzpunkt 230 bis 231°) isolieren.

II. Pharmakologischer Teil.

Über das pharmakologische Verhalten, der mit einem Aminoacylrest gekuppelten proteinogenen Amine ließ sich a priori kaum etwas voraussagen. Es war möglich, daß diese höhermolekularen basischen Produkte eine gegenüber den einfachen Aminen gesteigerte oder zum mindesten gleichwertige Toxizität zeigten, zumal die Arbeiten von Schittenhelm und Weichardt[1]), sowie von Knaffl-Lenz und Pick[2]) es sehr wahr-

[1]) Schittenhelm und Weichardt, Münch. med. Wochenschr. 1912, S. 67.

[2]) E. v. Knaffl-Lenz und E. P. Pick, Über das Verhalten der Plasteine im Tierkörper. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 71, 298 und 407.

scheinlich gemacht haben, daß neben den toxischen primären Aminen noch kompliziertere Zwischenprodukte des parenteralen Eiweißstoffwechsels existieren. Erinnerte man sich andererseits an die Entgiftungsvorgänge im Organismus, an die Bildung der Hippursäure und Ornithursäure, wo toxische Produkte (Benzoesäure) durch Kupplung mit Aminosäuren (Glykokoll, Ornithin) unschädlich gemacht werden, so war von den Peptaminen eher eine erhebliche Herabminderung der Toxizität zu erwarten.

Die von uns mit Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin und namentlich mit Glycyl-β-Imidazolyläthylamin ausgeführten Toxizitätsbestimmungen, die Prüfungen an überlebenden Testobjekten, sowie die Untersuchung der Blutdruck- und Respirationswirkung ergaben uns mit Sicherheit, daß die Kupplung der Amine mit dem Aminoacylrest einen Entgiftungsprozeß bedeutet.

Die untersuchten Peptamine sind zwar keineswegs ungiftig. Sie stehen aber in der Toxizität weit hinter den ihnen zugrunde liegenden Aminen zurück.

Nach Dale und Laidlaw wirkt β-Imidazolyläthylamin an einem Kaninchen von mittlerer Größe bei intravenöser Injektion in Dosen von 3 bis 5 mg tödlich. Von Glycyl-β-Imidazolyläthylamin wurden viel größere Dosen vertragen. 0,05 g einem 2,85 kg schweren Kaninchen in die Ohrvene injiziert, hatten leichte Respirationsstörungen zur Folge, erst 0,10 g, also etwa das 20fache der tödlichen Dosis, von β-Imidazolyläthylamin töteten ein 2,09 kg schweres Kaninchen. Das Tier war bald nach der Injektion apathisch, atmete unregelmäßig und schwach, die hinteren Extremitäten erschienen wie gelähmt, aus der Rückenlage vermochte es sich nicht aufzurichten. Nach 10 Minuten setzten heftige Bronchialkrämpfe ein, die bald zum Tode führten.

Am Meerschweinchen (500 g) zeigten sich 5 mg Glycyl-β-Imidazolyläthylamin subcutan injiziert ohne Wirkung. 0,01 g verursachte an einem 450 g schweren Tier Bronchialkrämpfe, die etwa 20 Minuten nach der Injektion den Exitus herbeiführten.

Es muß dabei vorläufig unentschieden bleiben, ob die nachgewiesene Toxizität, sowie sämtliche im folgenden beschriebenen pharmakologischen Effekte wirklich dem Glycyl-β-Imidazolyläthylamin bzw. dem Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin zuzuschreiben sind. Bei der großen Analogie im Aufbau der Peptamine und Polypeptide erscheint es nämlich wahrscheinlich, daß die peptolytischen Fermente des Blutes und der Gewebe imstande sind, die Verbindungen zu spalten, so daß aus dem injizierten Glycyl-β-Imidazolyläthylamin sukzessive β-Imidazolyläthylamin abgegeben würde.

Entsprechend der verminderten Toxizität der Peptamine erwies sich auch die Wirkung auf den Blutdruck und auf die Respiration im Vergleich zu den Wirkungen von p-Oxyphenyläthylamin und β-Imidazolyläthylamin bedeutend herabgesetzt. Blutdruckversuche wurden an mittelgroßen Tieren (2,5 bis 3,5 kg) ausgeführt. Zur Narkose wurden 0,8 g Urethan pro 1 kg Körpergewicht per os gegeben. Die Injektion erfolgte durch die V. femoralis. Die Wirkung von p-Oxyphenyläthylamin zeigt sich in einer intensiven Steigerung des Blutdrucks.

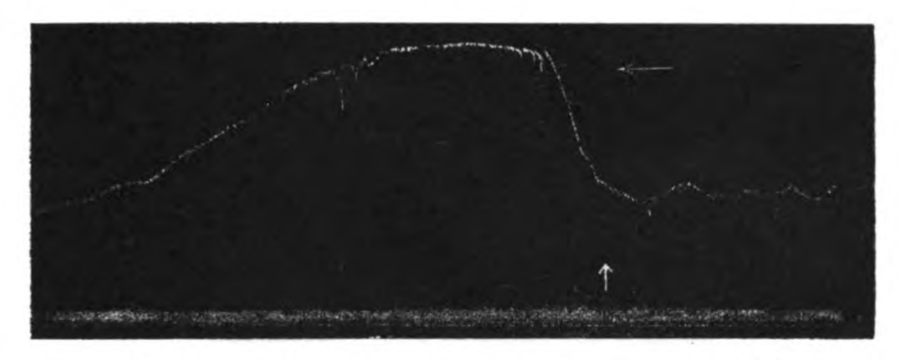


Fig. 1. Wirkung von 0,01 g p-Oxyphenyläthylaminchlorhydrat auf den Blutdruck des Kaninchens. Die Kurve ist von rechts nach links zu lesen.

β-Imidazolyläthylamin bewirkt je nach dem Zustande des Tieres eine starke Steigerung oder Senkung des Blutdrucks (vgl. auch Barger und Dale[1]) bei gleichzeitiger starker Respirationshemmung.

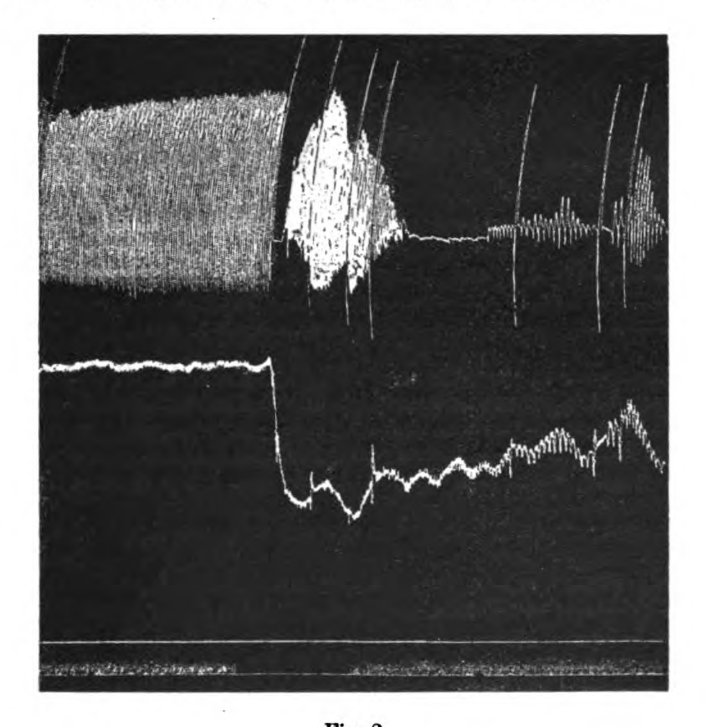


Fig. 2.

[1]) Barger und Dale, Centralbl. f. Physiol. 24, 885 bis 889, 1910.

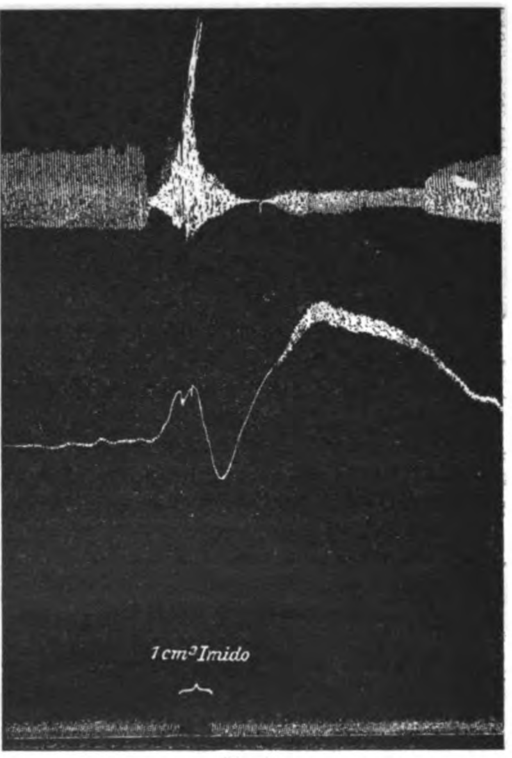


Fig. 3.

Fig. 2 und 3. Wirkung von 1 mg β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat auf Blutdruck und Respiration des Kaninchens. In Fig. 2 kommt eine Blutdrucksenkung, in Fig. 3 eine Blutdrucksteigerung zum Ausdruck.

Die Peptamine ergaben ein völlig abweichendes Verhalten. In Dosen von 1 bis 5 mg war überhaupt nichts Deutliches zu bemerken. Erst bei 0,01 g zeigte sich beim Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin eine schwache, beim Glycyl-β-Imidazolyläthylamin eine ausgesprochene Blutdrucksteigerung. Eine Respirationswirkung war nicht oder nur sehr schwach vorhanden.

Weniger erheblich, wenn auch deutlich ausgesprochen sind die Differenzen zwischen Amin- und Peptaminwirkung an den überlebenden Organen. Wir verwendeten den nach Magnus isolierten Meerschweinchendarm, den Uterus von Katzen und Ratten nach der Methode von Kehrer und das isolierte Froschherz nach Engelmann.

Der äußerst empfindliche Meerschweinchendarm eignet sich trotz seiner wenig regelmäßigen rhythmischen Bewegungen für vergleichende Bestimmungen bedeutend besser als der regelmäßig arbeitende Kaninchendarm, der weniger reaktionsfähig ist und viel eher individuelle Schwankungen zeigt. Die Darmstücke waren nach der früher angegebenen Methode in 100 ccm Ringer-Lösung suspendiert.

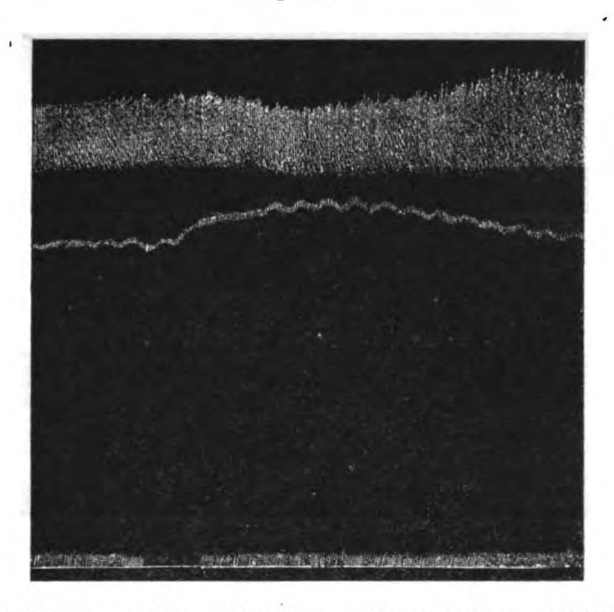


Fig. 4. Wirkung von 0,02 g Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin auf Blutdruck und Respiration des Kaninchens.

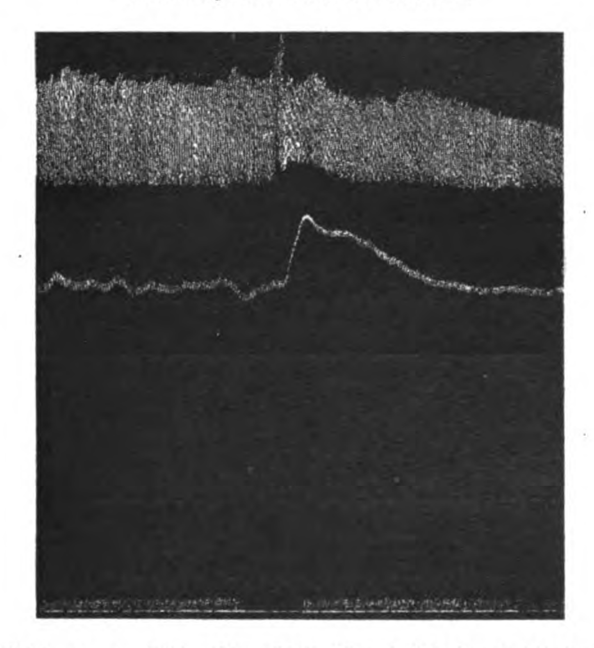


Fig. 5. Wirkung von 0,01 g Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat auf Blutdruck und Respiration des Kaninchens.



Fig. 6. Wirkung von 0,01 g Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin am überlebenden in 100 ccm Ringer-Lösung suspendierten Meerschweinchendarm.

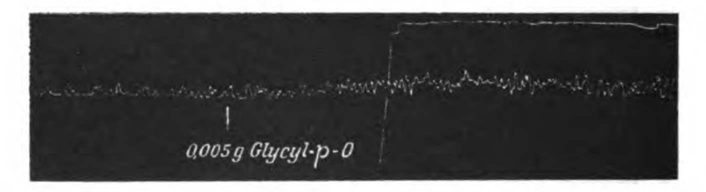


Fig. 7. Wirkung von 0,005 g Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin am überlebenden Meerschweinchendarm (Minimaldosis).

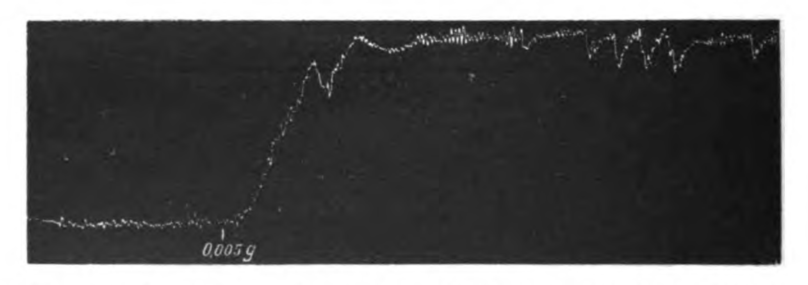


Fig. 8. Wirkung von 0,005 g Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat am überlebenden Meerschweinchendarm.



Fig. 9. Wirkung von 0,00005 g Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat am überlebenden Meerschweinchendarm.

Wie aus Fig. 6 bis 9 hervorgeht, zeigen die Peptamine eine deutlich tonussteigernde Wirkung. Während aber beim p-Oxyphenyläthylamin die Minimaldosis bei ca. 1:100000 bis 1:50000, liegt, ist sie

bei Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin bei 1:20000 bis 1:40000. Beim Glycyl-β-Imidazolyläthylamin liegt die Grenzdosis bei 1:20000000, beim β-Imidazolyläthylamin bei 1:200000000 bis 1:300000000.

Am deutlichsten illustriert sich das quantitativ differente Verhalten von β-Imidazolyläthylamin und Glycyl-β-Imidazolyläthylamin in Fig. 10.



Fig. 10. Vergleich der Wirkung von Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat und hydrolysiertem Glycyl-β-Imidazolyläthylaminchlorhydrat am überlebenden Meerschweinchendarm.

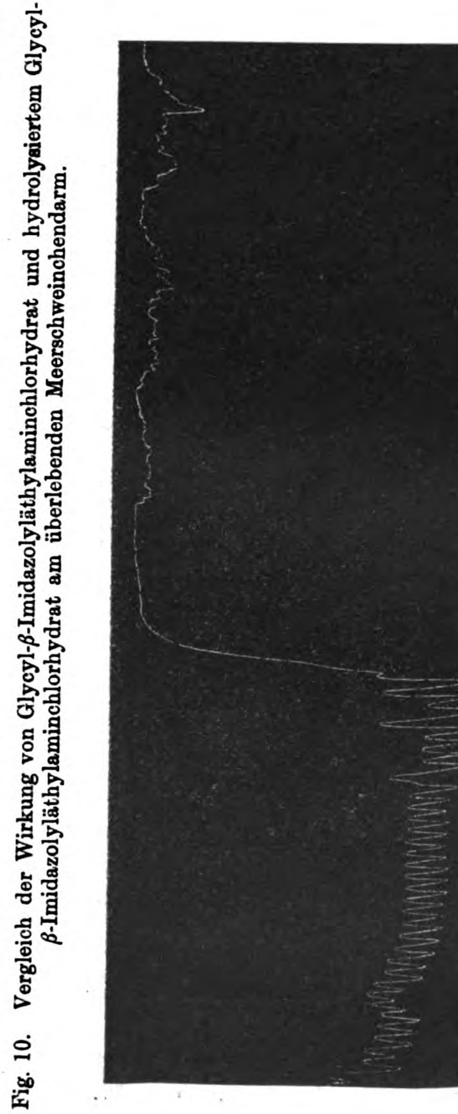


Fig. 11. Wirkung von 1 mg Glycyl-β-Imidazolyläthylamin am überlebenden virginellen Katzenuterus.

Hier wurde an einem fast inaktiven Darm die Wirkung einer Lösung von Glycyl-β-Imidazolyläthylamin verglichen mit der Wirkung einer vorher mit konzentrierter Salzsäure hydrolysierten Lösung des Pept-



Fig. 12. Wirkung von 0,1 mg Glycyl-β-Imidazolyläthylamin am überlebenden virginellen Katzenuterus.



Fig. 13. Wirkung von 0,1 mg Glycyl-β-Imidazolyläthylamin am überlebenden trächtigen Katzenuterus.

amins, die also Glykokoll und β-Imidazolyläthylamin in ungebundenem Zustande nebeneinander enthielt. Die Konzentration der Lösungen war dieselbe.

Die Versuche am überlebenden Uterus wurden in derselben Weise durchgeführt wie die Darmversuche. Am überlebenden Katzenuterus wirkt Glycyl-β-Imidazolyläthylamin contractionserregend (Fig. 11 und 12), und zwar am trächtigen (Fig. 13) in gleicher Weise wie am virginellen. Am Rattenuterus zeigten die Peptamine wie die Amine ein inverses Verhalten. Sie wirken tonussenkend, und zwar wie aus Fig. 14 und 15 hervorgeht, bedeutend weniger als die Amine.

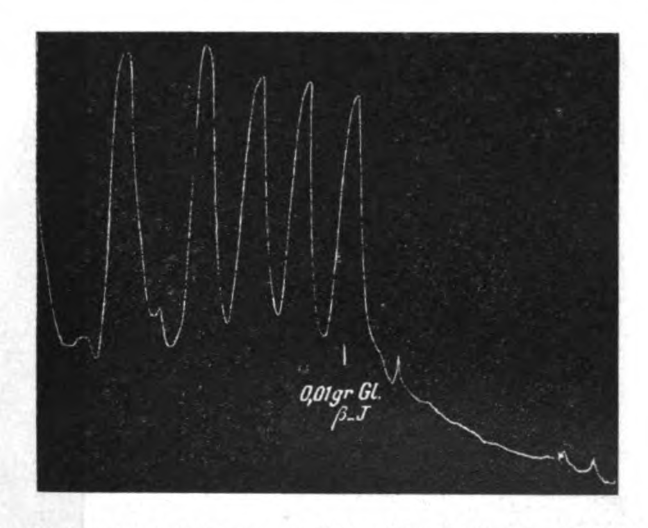


Fig. 14. Tonussenkende Wirkung von 0,01 g Glycyl-β-Imidazolyläthylamin am überlebenden Rattenuterus.

Die geringsten Differenzen zwischen Amin- und Peptaminwirkung zeigt das überlebende Froschherz. Hier verursachte sowohl β-Imidazolyläthylamin in der Konzentration 1:200 wie Glycyl-β-Imidazolyläthylamin in der Konzentration 1 : 100 eine bedeutende Verkleinerung bis völliges Auslöschen der Herzpulse. Gleichzeitig ist die Frequenz vermindert. Durch Auswaschen mit Ringer-Lösung läßt sich die Giftwirkung beseitigen. Die Grenzdosis scheint für beide Substanzen bei 1:500 zu liegen (Fig. 16 bis 18).

Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin bewirkt in einer Konzentration von 1:100 Verkleinerung der Amplitude und Frequenzverminderung, bei 1:150 zeigt sich ausgesprochene Gruppenbildung, deren Anfänge jedoch schon bei 1:300 sichtbar werden (Fig. 19 bis 21).

Ähnlich, nur etwas intensiver, sind die Effekte des p-Oxyphenyläthylamins in Fig. 22 und 23.

Auch hier sind die Wirkungen reversibel und lassen sich durch 2maliges Auswaschen mit Ringer-Lösung beseitigen.

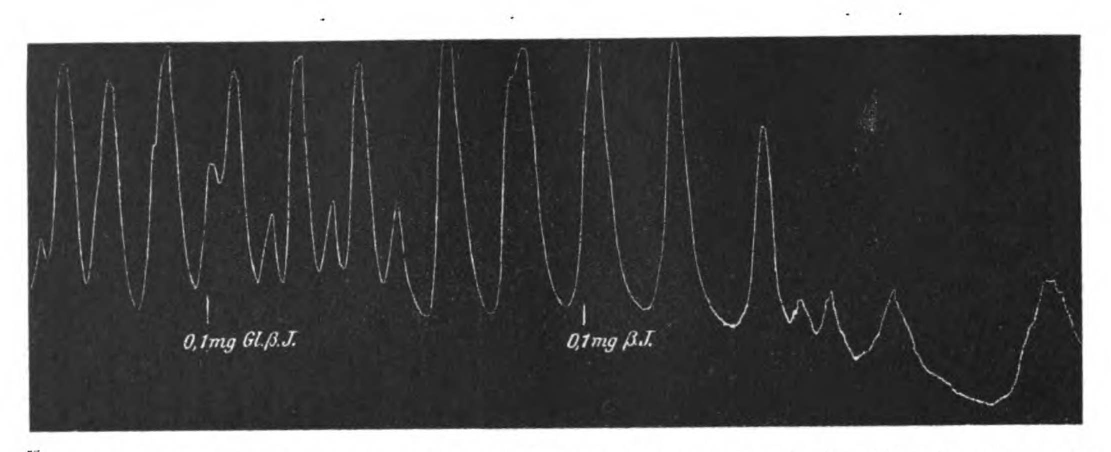
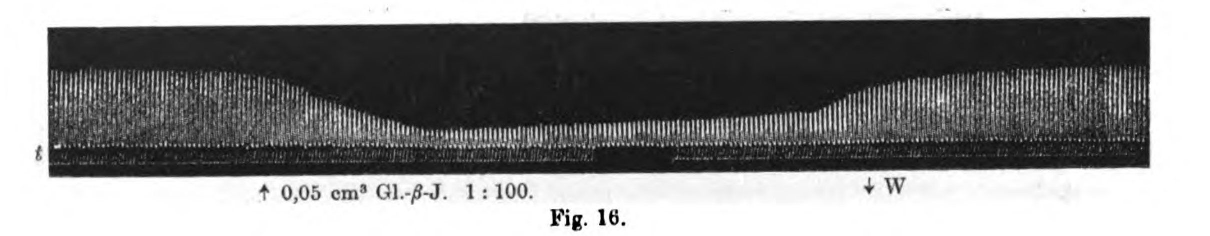


Fig. 15. Vergleich der Wirkung von Glycyl-β-Imidazolyläthylamin und β-Imidazolyläthylamin am überlebenden Rattenuterus. 0,1 mg Glycyl-β-Imidazolyläthylamin bewirkten kaum merkliche Tonusänderung, 0,1 mg β-Imidazolyläthylamin intensive Tonussenkung. Infolge der starken Tonussenkung verlor der Schreibhebel den Kontakt mit der Kymographionfläche; dieser Teil der Kurve mußte daher zum Teil von Hand nachgeführt werden.



↑ 0,05 cm³ Gl.-β-J. 1 : 100. ↓ W

Fig. 16.

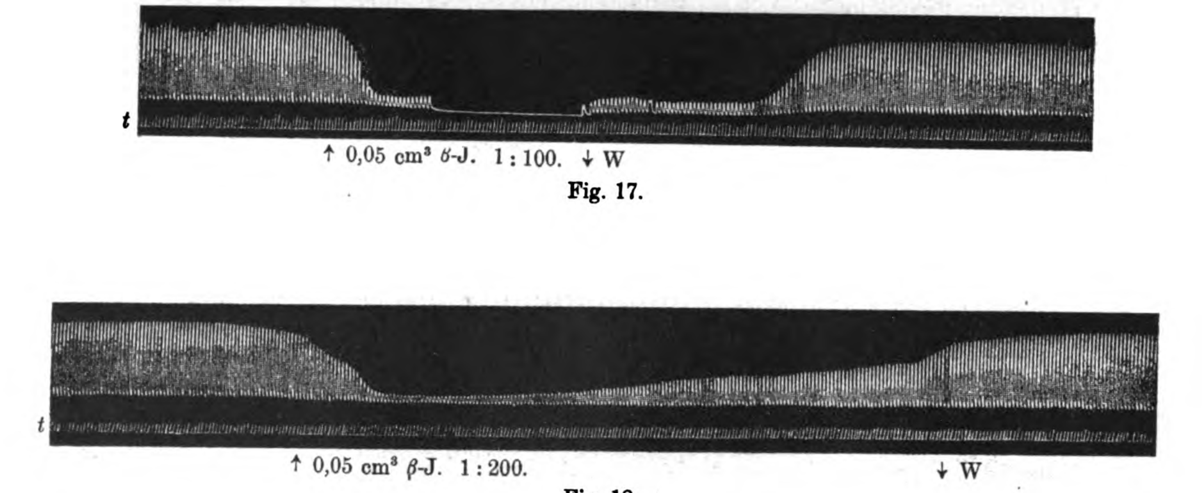


Fig. 17.

Fig. 18.

Fig. 16 bis 18. Wirkung von β-Imidazolyläthylamin und Glycyl-β-Imidazolyläthylamin am überlebenden Froschherzen. Bei ↑ wurde je 0,05 ccm der zu prüfenden Lösung zugegeben, und zwar in Fig. 16 0,05 ccm Glycyl-β-Imidazolyläthylamin 1:100, in Fig. 17 β-Imidazolyläthylamin 1:100, in Fig. 18 β-Imidazolyläthylamin 1:200. Bei ↓ wurde 2 mal mit Ringer-Lösung ausgespült, *t* ist die Zeitmarkierung in Sekunden.

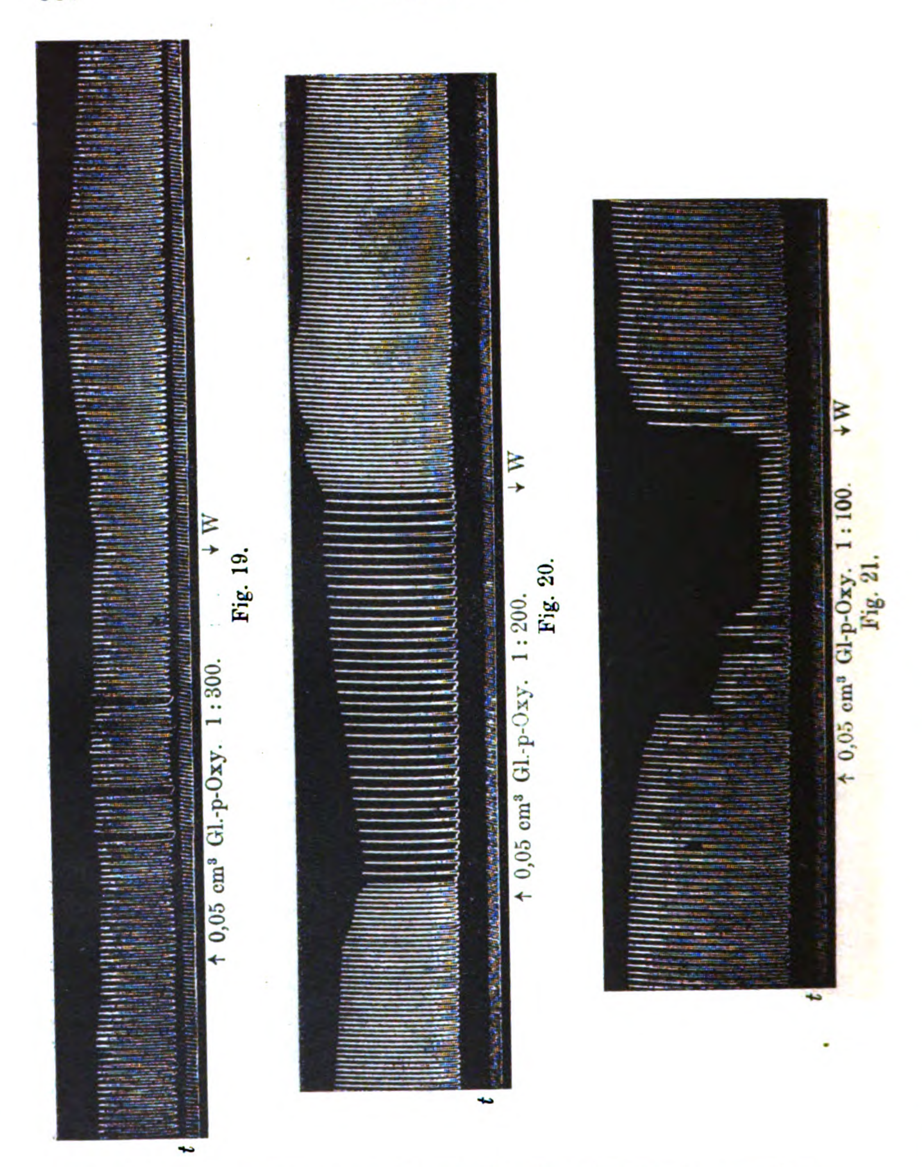


Fig. 19 bis 21. Wirkung von Glycyl-p-Oxyphenyläthylamin am überlebenden Froschherzen. Bei Fig. 19 ↑ wurde die Konzentration 1:300, in Fig. 20 ↑ 1:200, in Fig. 21 ↑ 1:100 zugegeben. Bei ↓ erfolgte Spülung mit Ringer-Lösung.

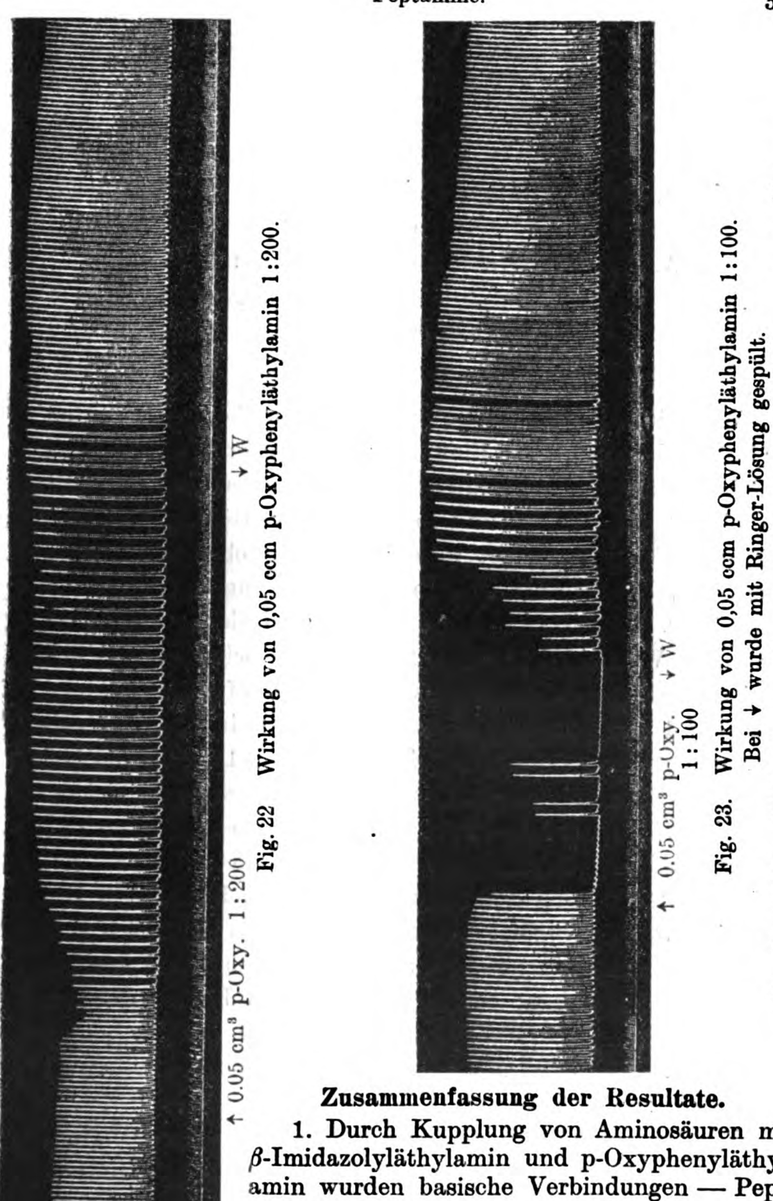


Fig. 22 Wirkung von 0,05 ccm p-Oxyphenyläthylamin 1:200.

Fig. 23. Wirkung von 0,05 ccm p-Oxyphenyläthylamin 1:100. Bei ↓ wurde mit Ringer-Lösung gespült.

Fig. 22 und 23. Wirkung von p-Oxyphenyläthylamin am überlebenden Froschherzen.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Durch Kupplung von Aminosäuren mit β-Imidazolyläthylamin und p-Oxyphenyläthylamin wurden basische Verbindungen — Peptamine — hergestellt.

2. Diese Kupplungsprodukte zeigen, wie die zugrunde liegenden Amine, eine periphere Wirkung auf die glatte Muskulatur.

Die Wirkung ist jedoch in quantitativer Hinsicht erheblich abgeschwächt.

Über Invertasereaktionen bei gemischten Hefekulturen.

Von

A. J. J. Vandevelde und A. Vanderstricht.

(Mitteilung aus dem Städtischen chemischen und bakteriologischen Untersuchungsamt zu Gent.)

(Eingegangen am 13. Mai 1913.)

Wir haben vergleichende Untersuchungen über die Inversion des Rohrzuckers unter dem Einfluß von verschiedenen, in Rein- und als Mischkultur gewachsenen Hefen unternommen, und zwar mit den folgenden Rassen, die im Laboratorium des Höheren Gärungsinstitute zu Gent gezüchtet waren: Frohberg (obergärig), Logos (obergärig), zwei Carlsbergarten I und II (untergärig), Saaz (untergärig). Jede Rasse wurde erst in sterilisierter Bierwürze während 1 Woche bei 18° zur Entwicklung belassen, und aus den frischen, gut geschüttelten Kulturen wurden für die einzelnen Hefen je 1 ccm, für die gemischten 0,5 ccm in 25 ccm sterilisierter Bierwürze (D = 1,030) eingesät. Nach 1 Woche bei 18° waren die Hefen für unsere Untersuchungen genug entwickelt.

Die Würze wurde erst dekantiert und die am Boden der Gärungsflaschen gesammelte Hefe mit sterilem Wasser geschüttelt, 24 Stunden stehen gelassen und endlich durch Dekantation vom Spülwasser befreit. Auf diese Weise ließen sich aus den Würzen Invertasepräparate aus einzelner und aus gemischter Hefe bereiten; ebenso waren wir im Besitze der von Würze befreiten und gut abgepreßten einzelnen und gemischten Heferassen. Alle diese Kulturen wurden doppelt bereitet und die Proben zweifach angestellt.

Die bereiteten Hefen wurden mit je 100 ccm einer 10%igen Saccharoseauflösung versetzt, mit dieser Flüssigkeit gut gemischt und bei 18° belassen. Aus den Gärungsflaschen wurden zu bestimmten Zeiten 20 ccm herauspipettiert; diese Mengen wurden mit 10 ccm einer 10%igen Bleiessiglösung und 10 ccm einer gesättigten Natriumsulfatlösung versetzt und nach Filtration im 20-cm-Rohr des Laurentschen Saccharimeters beobachtet. Die

gefundenen Werte sind also mit 2 zu multiplizieren und in den folgenden Tabellen mit den Zeichen + oder — angegeben.

Die Prüfung der Invertase enthaltenden Würze geschah durch Versetzen von 100 ccm der 10%igen Saccharoselösung mit 5 ccm der Würze, in der nach 1 wöchiger Gärung die Maltose zerlegt war und die zurückgebliebenen Dextrine nur einen unbedeutenden Einfluß auf die Polarisation ausüben konnten. Diese Flüssigkeiten waren hell und unmittelbar ohne Filtration oder Behandlung mit Bleizucker polarisationsfähig. In unseren Tabellen sind auch diese Ergebnisse in Saccharimetergraden (nach Laurent) ausgedrückt.

In den Proben mit den Hefen wurde keine deutliche alkoholische Gärung beobachtet, und nach 24 Stunden wurden die überbleibenden Flüssigkeiten mit Salzsäure vollständig invertiert, um die Menge des von der eventuell stattgefundenen alkoholischen Gärung zersetzten Zuckers zu bestimmen. Wir fanden immer für Invertzucker nahezu den theoretischen Wert. Daraus ergab sich, daß unter dem Einflusse der benutzten Hefekulturen nur unbedeutende Zuckermengen vergoren waren und folglich die reine Invertasereaktion allein zur Beobachtung gelangt ist.

In jeder der folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der zwei Kontrollreihen angegeben.

I. Logos und Frohberg.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Logos	Frohberg	Logos + Frohberg		Logos	Frohberg	Logos + Frohberg
58,5	58,5	58,5	0	58,5	58,5	58,5
56,0	51,0	52,2	30	—	—	—
53,6	42,4	46,4	60	58,5	58,5	58,5
51,0	34,6	42,4	90	—	—	—
46,0	+ 20,6	+ 30,6	150	—	—	—
—	—	—	300	58,2	58,0	58,0
+ 26,0	− 10,0	− 2,0	400	—	—	—
—	—	—	1440	+ 57,3	+ 55,3	+ 57,3
59,0	59,0	59,0	0	57,0	57,0	57,0
52,6	41,0	48,4	60	—	—	—
46,8	26,6	39,4	120	—	—	—
42,4	+ 8,4	28,2	180	—	—	—
—	—	—	300	55,2	52,4	54,9
32,8	− 6,4	13,8	330	—	—	—
+ 26,4	− 12,4	+ 3,4	420	—	—	—
—	—	—	1380	+ 49,4	+ 38,0	+ 46,0

Die Logoshefe wirkt wenig invertierend, die Frohberghefe dagegen stärk; das Verhalten der Mischhefen liegt zwischen dem der einzelnen Kulturen. In den Proben mit Würze fanden wir in der ersten Reihe keinen Unterschied zwischen den Flüssigkeiten mit Logoswürze und mit Logos-Carlsberg-Würze.

Durch vollständige Inversion der ursprünglichen Saccharoselösung und der nach 24 Stunden teilweise invertierten Flüssigkeit wurde festgestellt, daß die mit den Hefekulturen versetzten Zuckerlösungen nicht alkoholisch oder nur unbedeutend gegoren hatten, wie es sich aus den folgenden polarimetrischen Messungen ableiten läßt.

1. Reihe. Berechnet: — 21,12 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 21,5 und — 21,5 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 21,32 Pol.
Gefunden: — 19,5, — 19,5 und — 19,5 Pol.

Damit waren unsere Untersuchungen für das Studium der Invertaseumsetzung geeignet.

II. Logos und Carlsberg I.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Logos	Carlsberg I	Logos + Carlsb. I		Logos	Carlsberg I	Logos + Carlsb. I
57,0	57,0	57,0	0	58,5	58,5	58,5
53,0	44,4	51,0	60	—	—	—
51,0	35,0	47,4	120	—	—	—
48,0	27,2	44,8	150	—	—	—
42,6	+ 7,4	34,0	300	56,7	54,0	56,2
+ 39,0	— 0,8	+ 28,0	360	—	—	—
—	—	—	2880	+ 50,5	+ 34,0	+ 48,2
58,0	58,0	58,0	0	58,0	58,0	58,0
54,0	41,0	50,0	60	—	—	—
48,0	25,2	43,2	120	—	—	—
46,0	21,0	41,0	150	—	—	—
37,0	+ 0,2	28,0	300	56,0	53,0	55,2
+ 33,0	— 6,4	+ 22,0	360	—	—	—
—	—	—	2880	+ 50,0	+ 25,6	+ 44,3

Während die Logos-Hefe schwach spaltend wirkt, invertiert Carlsberg I stärker; mit Hefe und mit Würze fanden wir für Logos + Carlsberg I dazwischenliegende Werte. Der Effekt der Carlsberg-Hefen ist nicht groß.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 20,2 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 21,5 und — 21,5 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 20,9 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 21,5 und — 21,5 Pol.
Es fand keine alkoholische Gärung statt.

III. Logos und Carlsberg II.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Logos	Carlsberg II	Logos + Carlsb. II		Logos	Carlsberg II	Logos + Carlsb. II
57,0	57,0	57,0	0	58,5	58,5	58,5
53,0	46,0	48,0	60	—	—	—
51,0	40,0	42,6	120	—	—	—
48,0	33,4	36,8	150	—	—	—
42,6	16,2	21,0	300	56,7	55,0	55,4
+ 39,0	+ 10,0	+ 15,0	360	—	—	—
—	—	—	2880	+ 50,5	41,1	46,5
58,0	58,0	58,0	0	58,0	58,0	58,0
54,0	40,0	47,0	60	—	—	—
48,0	33,0	37,6	120	—	—	—
46,0	29,0	35,2	150	—	—	—
37,0	13,8	18,0	300	56,0	54,2	54,9
+ 33,0	+ 6,2	+ 12,0	360	—	—	—
—	—	—	2880	+ 50,0	+ 33,2	41,5

Die Ergebnisse mit den Mischhefen und mit den aus Mischhefen bereiteten Würzen befinden sich zwischen denen der einzelnen Hefen. Der Einfluß der Carlsberg-Hefen ist hier sehr bedeutend.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 20,2 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 21,5, — 21,5 Pol.
2. Reihe. Berechnet: — 20,9 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 21,5, — 21,5 Pol.

Also keine alkoholische Gärung.

IV. Logos und Saaz.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Logos	Saaz	Logos + Saaz		Logos	Saaz	Logos + Saaz
58,5	58,5	58,5	0	57,5	57,5	57,5
52,8	41,0	47,0	60	—	—	—
50,0	30,8	40,6	120	—	—	—
47,0	+ 14,4	30,8	180	—	—	—
—	—	—	300	57,0	53,3	55,0
37,4	— 5,6	12,0	330	—	—	—
+ 33,8	— 10,0	+ 6,0	375	—	—	—
—	—	—	1440	+ 51,0	+ 41,4	+ 46,7

IV. Logos und Saaz (Fortsetzung.)

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Logos	Saaz	Logos + Saaz		Logos	Saaz	Logos + Saaz
59,0	59,0	59,0	0	57,5	57,5	57,5
52,6	37,0	48,2	60	—	—	—
48,4	20,0	40,0	120	—	—	—
44,0	+ 14,4	36,0	150	—	—	—
38,0	− 3,0	22,0	300	55,5	52,1	55,0
+ 34,0	− 8,6	+ 14,0	390	—	—	—
—	—	—	1440	+ 51,2	+ 35,5	+ 45,8

Mit den Hefen und mit der Würze erhielten wir für die Mischkulturen Daten, die zwischen denen für die einzelnen Hefen liegen.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 21,1 Pol.
Gefunden: — 21,9, — 22,6, — 22,3 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 21,3 Pol.
Gefunden: — 21,9, — 22,9, — 21,9 Pol.

Keine alkoholische Gärung.

V. Frohberg und Carlsberg I.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Frohberg	Carlsberg I	Frohberg + Carlsb. I		Frohberg	Carlsberg I	Frohberg + Carlsb. I
58,5	58,5	58,5	0	57,5	57,5	57,5
48,0	44,6	44,2	60	—	—	—
34,2	36,0	36,4	120	—	—	—
20,8	22,4	23,0	180	—	—	—
—	—	—	300	54,6	53,4	54,0
+ 1,0	+ 1,4	+ 2,8	330	—	—	—
− 4,2	− 4,0	− 2,4	375	—	—	—
—	—	—	1440	+ 45,0	+ 38,0	+ 43,7
59,0	59,0	59,0	0	57,5	57,5	57,5
38,6	41,0	38,8	60	—	—	—
21,0	24,6	22,8	120	—	—	—
+ 14,8	20,0	16,8	150	—	—	—
− 1,0	0	+ 0,2	300	54,2	52,1	53,4
− 7,0	− 6,0	− 5,8	390	—	—	—
—	—	—	1440	+ 43,7	+ 31,0	+ 41,2

Die zwei Hefen Frohberg und Carlsberg I besitzen hier das gleiche Inversionsvermögen, und die Ergebnisse für die Mischhefen sind wenig herabgedrückt, nämlich — 2,4 (— 4,2 und — 4,0 für die einzelnen Hefen) in der 1. Reihe, — 5,8 (— 7 und — 6 für die einzelnen Hefen) in der 2. Reihe. Die Ergebnisse für Mischhefen liegen zwischen denen für die einzelnen, in den Proben mit den Würzen, aber näher bei den Frohberg-Hefen.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: —21,1 Pol.
Gefunden: —22,6, —22,3, —22,3 Pol.

2. Reihe. Berechnet: —21,3 Pol.
Gefunden: —21,7, —21,9, —21,9 Pol.

Nach diesen Ergebnissen war es keine alkoholische Gärung.

VI. Frohberg und Carlsberg II.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Frohberg	Carlsberg II	Frohb. + Carlsb. II		Frohberg	Carlsberg II	Frohb. + Carlsb. II
57,0	57,0	57,0	0	58,5	58,5	58,5
34,0	46,0	42,0	60	—	—	—
18,0	40,0	30,0	120	—	—	—
+ 6,8	33,4	21,2	150	—	—	—
— 9,0	16,2	+ 1,6	300	54,1	55,0	55,0
—12,0	+10,0	— 4,0	360	—	—	—
—	—	—	2880	+34,0	+41,1	+37,6
58,0	58,0	58,0	0	58,0	58,0	58,0
30,8	40,0	32,6	60	—	—	—
10,2	33,0	13,6	120	—	—	—
+ 5,4	29,0	+ 6,4	150	—	—	—
—12,0	13,8	—10,4	300	52,8	54,2	53,0
—14,0	+ 6,2	—12,6	360	—	—	—
—	—	—	2880	+26,4	+33,2	+26,5

Die Ergebnisse für die Mischhefen befinden sich zwischen denen für die einzelnen Hefen, bei den Hefen wie bei den Würzen.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und der 24 Stunden gegorenen Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: —20,2 Pol.
Gefunden: —21,9, —21,9, —21,9 Pol.

2. Reihe. Berechnet: —20,9 Pol.
Gefunden: —19,8, —19,8, —19,8 Pol.

Keine alkoholische Gärung.

VII. Frohberg und Saaz.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Saaz	Frohberg	Saaz + Frohberg		Saaz	Frohberg	Saaz + Frohberg
58,5	58,5	58,5	0	57,5	57,5	57,5
41,0	43,0	42,4	60	—	—	—
30,8	34,2	32,4	120	—	—	—
+14,4	20,8	+19,0	180	—	—	—
—	—	—	300	53,3	54,6	54,0
— 5,6	+ 1,0	— 1,6	330	—	—	—
—10,0	— 4,2	— 6,0	375	—	—	—
—	—	—	1440	+41,4	+45,0	+43,7

VII. Frohberg und Saaz (Forsetzung.)

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Saaz	Frohberg	Saaz + Frohberg		Saaz	Frohberg	Saaz + Frohberg
59,0	59,0	59,0	0	57,5	57,5	57,5
37,0	38,6	40,4	60	—	—	—
20,0	21,0	23,4	120	—	—	—
+ 14,4	+ 14,8	18,6	150	—	—	—
− 3,0	− 1,0	+ 0,2	300	52,1	54,2	54,2
− 8,6	− 7,0	− 5,8	390	—	—	—
—	—	—	1440	+ 35,5	+ 43,7	+ 41,4

Die Hefen Saaz und Frohberg geben wenig abweichende Ergebnisse, wenn sie gemischt oder einzeln gebraucht werden.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 21,1 Pol.
Gefunden: — 22,6, — 22,6, — 21,9 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 21,3 Pol.
Gefunden: — 21,5, — 22,6, — 21,9 Pol.

Wie bei dem schon studierten Falle ist hier auch keine alkoholische Gärung wahrzunehmen, wie schon aus dem Aussehen der Flüssigkeit deutlich hervorging.

VIII. Frohberg und Logos.

Siehe Logos + Frohberg (I).

IX. Carlsberg I und Carlsberg II.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Carlsberg I	Carlsberg II	Carlsb. I + Carlsb. II		Carlsberg I	Carlsberg II	Carlsb. I + Carlsb. II
58,5	58,5	58,5	0	58,5	58,5	58,5
44,8	43,0	44,4	60	—	—	—
40,0	34,0	34,8	120	—	—	—
32,0	26,0	25,4	165	—	—	—
—	—	—	300	53,5	54,0	53,5
13,0	6,8	+ 4,8	315	—	—	—
+ 6,4	+ 0,2	− 3,6	375	—	—	—
—	—	—	1380	+ 39,8	+ 44,4	+ 43,5
58,7	58,7	58,7	0	57,0	57,0	57,0
48,2	44,6	45,0	60	—	—	—
40,8	36,0	36,6	120	—	—	—
32,2	24,6	25,0	180	—	—	—
14,4	+ 5,0	6,0	300	53,4	53,7	53,4
+ 9,0	− 0,2	+ 0,4	360	—	—	—
—	—	—	1440	+ 39,5	+ 44,2	+ 42,4

Alle diese Ergebnisse sind ziemlich dieselben; die zwei Hefen Carlsberg I und Carlsberg II scheinen hier dieselben Eigenschaften zu besitzen.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 21,1 Pol.
Gefunden: — 19,5, — 19,5, — 19,5 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 21,2 Pol.
Gefunden: — 21,9, — 21,9, — 21,7 Pol.

Keine deutlich alkoholische Gärung.

X. Carlsberg I und Saaz.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Saaz	Carlsberg I	Saaz + Carlsberg		Saaz	Carlsberg I	Saaz + Carlsberg
58,5	58,5	58,5	0	58,5	58,5	58,5
40,0	44,8	37,5	60	—	—	—
30,0	40,0	27,0	120	—	—	—
+ 19,0	32,0	+ 14,0	165	—	—	—
—	—	—	300	51,5	53,5	53,0
− 0,6	13,0	− 6,0	315	—	—	—
− 7,6	+ 6,4	− 10,0	375	—	—	—
—	—	—	1380	+ 38,5	+ 39,8	+ 38,5
58,7	58,7	58,7	0	57,0	57,0	57,0
40,4	48,2	38,6	60	—	—	—
29,4	40,8	27,0	120	—	—	—
+ 15,2	32,2	+ 12,6	180	—	—	—
− 1,6	14,4	− 5,6	300	53,5	53,4	54,1
− 7,4	+ 9,0	− 11,0	360	—	—	—
—	—	—	1440	+ 39,6	+ 39,5	+ 40,0

Mit den Hefen Saaz und Carlsberg I sind bei den Mischungen die Ausschläge niedriger als bei den einzelnen Hefen. Die Hefe Saaz zeigt ein starkes Inversionsvermögen, die Hefe Carlsberg I dagegen ein schwächeres. Die Ergebnisse mit den Würzen sind nahezu dieselben.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 21,1 Pol.
Gefunden: — 19,5, — 19,5, — 19,5 Pol.

2. Reihe. Berechnet: — 21,2 Pol.
Gefunden: — 21,3, — 21,5, — 21,5 Pol.

Keine deutliche alkoholische Gärung.

XI. Carlsberg I und Logos.

Siehe Logos und Carlsberg I (II).

XII. Carlsberg I und Frohberg.

Siehe Frohberg und Carlsberg I (V).

XIII. Carlsberg II und Saaz.

Saccharose mit Hefe			Nach Minuten	Saccharose mit Würze		
Saaz	Carlsberg II	Saaz + Carlsberg		Saaz	Carlsberg II	Saaz + Carlsberg
58,5	58,5	58,5	0	58,5	58,5	58,5
40,0	43,0	48,0	60	—	—	—
30,0	34,0	43,0	120	—	—	—
+ 19,0	26,0	38,0	165	—	—	—
—	—	—	300	51,5	54,0	54,0
– 0,6	6,8	21,0	315	—	—	—
– 7,6	+ 0,2	+ 13,0	375	—	—	—
—	—	—	1380	+ 38,5	+ 44,4	+ 42,8
58,0	58,0	58,0	0	58,0	58,0	58,0
41,0	48,6	44,2	60	—	—	—
28,0	39,6	33,6	120	—	—	+
+ 19,0	34,0	26,0	150	—	—	—
– 3,0	+ 15,0	+ 3,0	300	53,2	53,7	53,3
– 8,0	+ 8,8	– 3,0	360	—	—	—
—	—	—	1440	+ 38,5	+ 46,0	+ 41,7

Wir erhielten in den zwei Reihen mit Saaz- und Carlsberg II-Hefen wechselnde Ergebnisse. In der ersten Reihe fanden wir für die Mischhefen eine Verminderung der Inversionsgeschwindigkeit, in der zweiten Reihe dagegen liegen die Ergebnisse für die Mischkulturen zwischen denen der einzelnen Hefen. Mit den Würzen sind die Ergebnisse ziemlich übereinstimmend.

Vollständige Inversion der ursprünglichen und nach 24 Stunden invertierten Flüssigkeiten:

1. Reihe. Berechnet: — 21,1 Pol.
   Gefunden: — 19,5, — 19,5, — 19,5 Pol.
2. Reihe. Berechnet: — 20,9 Pol.
   Gefunden: — 21,3, — 21,3, — 21,5 Pol.

Wie in allen früheren Untersuchungen, ist auch hier keine deutliche alkoholische Gärung wahrzunehmen.

XIV. Carlsberg II und Logos.

Siehe Logos und Carlsberg II (III).

XV. Carlsberg II und Frohberg.

Siehe Frohberg und Carlsberg II (VI).

XVI. Carlsberg II und Carlsberg I.

Siehe Carlsberg I und Carlsberg II (IX).

XVII. Saaz und Logos.

Siehe Logos und Saaz (IV).

XVIII. Saaz und Frohberg.

Siehe Frohberg und Saaz (VII).

XIX. Saaz und Carlsberg I.
Siehe Carlsberg I und Saaz (X).
XX. Saaz und Carlsberg II.
Siehe Carlsberg II und Saaz (XIII).

Die Frohberg- und Saaz-Hefen wirken stark, die Logos- und die zwei Carlsberg-Hefen wenig invertierend. Bei den Mischkulturen liegen die Ergebnisse gewöhnlich zwischen denen, die wir für die einzelnen Hefen fanden. Allein mit den Mischungen Saaz + Carlsberg I und Saaz + Carlsberg II sind die Ergebnisse ziemlich wechselnd; mit Carlsberg I ist die Mischung stärker invertierend, mit Carlsberg II fanden wir einmal eine Verminderung der Inversion und einmal dazwischen befindliche Werte. Auch mit den Mischungen Frohberg + Carlsberg I und Saaz + Frohberg waren die gefundenen Verhältnisse ziemlich übereinstimmend. Ein Unterschied zwischen ober- und untergärigen Rassen konnte nicht festgestellt werden.

In einer früheren Mitteilung[1]) wurde beobachtet, daß bei den Vergärungen mit Mischhefen die alkoholische Gärung begünstigt wird, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hansen[2]) mit Mischkulturen von Saccharomyces apiculatus und Bierhefe, und von Müller-Thurgau[3]) mit Saccharomyces apiculatus und Weinhefe und in voller Übereinstimmung mit denen der industriellen Praxis. Da für die Inversion keine Begünstigung festgestellt werden konnte, kommen diese Erscheinungen allein der alkoholischen Gärung zugute.

---

[1]) A. J. J. Vandevelde, 8 Intern. Congress applied Chemistry New York 1912, 14, 191—202.

[2]) Hansen, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 4, 449, 1881.

[3]) Müller-Thurgau, Kochs Jahrbuch 6, 182, 1895.

Über die Bestimmung und das Vorkommen von Milchsäure im Harn.

Von

Max Dapper.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität Wien.)

(Eingegangen am 16. Mai 1913.)

Während wir über das Verhalten der Milchsäure im Blute und in den Organen, namentlich durch die Arbeiten der Embdenschen Schule in der letzten Zeit verhältnismäßig gut orientiert sind, fehlten uns bis jetzt nähere Kenntnisse darüber im Harn. Von den älteren Arbeiten auf diesem Gebiete wäre die Angabe Liebigs[1]) zu erwähnen, daß im normalen Harn auch bei Verarbeitung von großen Mengen, 50 und mehr Litern Harn, Milchsäure nicht isoliert werden konnte. Dagegen fanden zahlreiche Autoren bei verschiedenen Vergiftungen Auftreten von Milchsäure.

Ebenso wurde auch in anderen pathologischen Fällen, z. B. bei Eklampsie und Lebererkrankungen, Milchsäure gefunden.

Indessen sind alle diese Arbeiten mit Hilfe der wenig geeigneten Methode der Zinksalzisolierung durchgeführt worden. Da nun aber in neuerer Zeit die Milchsäurebestimmung durch das Verfahren von v. Fürth-Charnaß[2]) leicht zugänglich gemacht wurde und auch mit kleineren Mengen durchführbar, so versuchte ich, diese Verhältnisse einer systematischen Prüfung zu unterwerfen.

Meines Wissens liegen vorläufig keine Versuche zur Anwendung der v. Fürth-Charnaßschen Milchsäurebestimmung im Harn vor. Das von Schultz im Neubauer-Huppert Bd. 11

---

[1]) Liebig, Annal. d. Chem. u. Pharm. **50**, 166, 1844.

[2]) O. v. Fürth-Charnaß, diese Zeitschr. **26**, 199, 1910.

geschilderte Verfahren, das der älteren Jerusalemschen Arbeit entnommen ist, ist deshalb nicht direkt verwendbar, weil bekanntlich Jerusalem selbst s. Z. durch einen Rechnungsfehler zu fehlerhaften Resultaten gekommen ist, so daß das Verfahren nicht genügend fundiert erscheint. Ich versuchte zunächst, jedoch ohne Erfolg, die zeitraubende Extraktion der Milchsäure aus dem Harn dadurch zu umgehen, daß ich den Harn nach Einengen und Entfernung der Phenole, Aldehyde usw. durch Wasserdampfdestillation direkt der Oxydation mit Permanganat unterwarf. Hierbei überzeugte ich mich aber, daß man auf diese Weise großen Verlusten ausgesetzt ist, weshalb ich dieses Verfahren aufgab, trotzdem, wie folgender Versuch zeigt, Milchsäure mit Wasserdampf bei saurer Reaktion nicht flüchtig ist.

Als Analysenmaterial verwendete ich das bereits von v. Fürth-Charnaß benutzte Lithiumlactat. Käufliches Kahlbaumsches Lithiumlactat wurde zur Entfernung etwa anhaftender Verunreinigungen (fremde Fettsäuren) mit absolutem Alkohol mehrmals ausgekocht, das Salz aus wenig heißem Wasser umkrystallisiert und im Wasserthermostaten bei ca. 100° zur Gewichtskonstanz getrocknet und ins Vakuum gestellt.

Berechnung:

Glas + Substanz	13,378 g
Glas leer . . .	11,154 g
	2,224 g.

Diese 2,224 g reines milchsaures Lithium wurden in 300 ccm Wasser gelöst. Berechnung des milchsauren Lithiums auf Milchsäure:

Milchsäure $C_3H_6O_3$ Mol.-Gew. = 90,
Lithium lact. = $C_3H_5O_3Li$,
Lith. = 6,94 Gew., Mol.-Gew. 95,9.

Somit enthalten 30 ccm meiner milchsauren Lithiumlösung

$$\frac{0{,}2224 \times 90}{95{,}9}$$

= 0,2092 g reine Milchsäure.

Versuch 2.

30 ccm dieser Lösung, enthaltend also 0,2092 g reine Milchsäure, wurden nun einer länger dauernden Wasserdampfdestillation unterworfen, worauf die Milchsäurebestimmung im Milchsäureapparat angeschlossen wurde.

Berechnung:

Vorgelegt . . .	2 × 40 Bisulfit =	70,8 Jod
Zurücktitriert . .	15,6 + 16,3 Jod =	31,9 „
		38,9
× bek. Faktor d. Milchsäure	. . .	0,005
		0,1945 Milchsäure.

Milchsäure ist also auch bei Wasserdampfdestillation aus saurer Lösung praktisch nicht flüchtig.

Nun versuchte ich den Harn nach Einengen bei saurer Reaktion (zur Spaltung und Entfernung der Phenole und Kresole) bis zum Sirup in der Weise zu extrahieren, daß ich den Sirup mit gepulvertem Natriumsulfat in einen trockenen Brei verwandelte, diesen pulverisierte und mit Äther direkt einige Male extrahierte. Bei diesem Verfahren fand sich aber nur ein Teil der zugesetzten Milchsäure wieder. Ich glaube dies hauptsächlich auf das Einengen bei mineralsaurer Reaktion zurückführen zu müssen. Es scheint dabei Milchsäure zerstört zu werden.

Versuch 3.

500 ccm Harn (normal) + 30 ccm der milchsauren Lithiumlösung wurden unter Zusatz von verdünnter Salzsäure[1]) bis zum Sirup eingedampft und nach Natriumsulfat Zusatz extrahiert. Rückstand in Wasser gelöst. Lösung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und im Milchsäureapparat zunächst ohne Zusatz destilliert.

Destillat: Keine Millonsche Reaktion, keine direkt jodbindende Substanzen.

Hierauf wurde die Milchsäurebestimmung im Apparat durch Oxydation angeschlossen. Dabei fand ich die zugesetzte Milchsäure nicht wieder.

Gelegentlich dieser Versuche bemerkte ich hier und da Differenzen bei der Titerbestimmung des Bisulfits, auf die v. Fürth-Charnaß nicht aufmerksam gemacht, die mir aber wichtig erscheinen. Man bekommt nämlich differente Werte, wenn man einerseits Jod zu Bisulfit titriert, andererseits umgekehrt. Diesen Fehler, den bereits Treadwell in seinem Lehrbuch „Analytische Chemie" erwähnt, habe ich in meinen Versuchen dadurch zu vermeiden gesucht, daß ich stets zur Bestimmung des Titers eine der ganzen vorgelegten Menge Bisulfit gleiche Bisulfitmenge mit Jod titrierte, wobei immer das Mittel aus mehreren solchen Bestimmungen genommen wurde.

---

[1]) Salzsäure sollte den Zweck haben, jodbindende Substanzen des Harnes, z. B. Phenole und Kresole usw., die bekanntlich in Form von Schwefelsäureestern vorkommen, von der Zusammensetzung

$$SO_2\langle{}^{OC_6H_5}_{OC_6H_5}$$

zu spalten, wobei der alkoholische Anteil, also Phenole und Kresole, flüchtig ist.

Da ich so durch direkte Anwendung des v. Fürth-Charnaßschen Verfahrens auf Harn zu keinen brauchbaren Resultaten kommen konnte, mußte ich zu den wesentlich umständlicheren und komplizierteren Versuchen der Isolierung der Milchsäure auf dem Wege der Ätherextraktion übergehen.

Dieses Verfahren wurde bereits früher für Fettsäurengewinnung aus verschiedenen Flüssigkeiten und Organen vielfach benutzt. Es mußte also festgestellt werden, ob und in welcher Weise dieses Verfahren am zweckmäßigsten zur Bestimmung der Milchsäure im Harn zu gebrauchen sei.

Daß die Extraktion der im Harn befindlichen Milchsäure nicht leicht gelingt — bei der großen Löslichkeit der Milchsäure in Wasser —, beweisen meine Versuche, ohne Extraktionsapparate auszukommen. Es mußte daher zu den letzteren gegriffen werden, und ich bediente mich des vorzüglich funktionierenden Lindtschen Apparates.

Die Methodik gestaltete sich nach zahlreichen Vorversuchen nun folgenderweise:

500 ccm des Harns werden ohne jeden Zusatz im 2-l-Jenaer-Kolben im Vakuum unter Anwendung der üblichen Capillare bei einer Temperatur von etwa 50 bis 60° auf etwa 100 bis 120 ccm eingeengt. Es empfiehlt sich nicht, das Vakuum höher zu machen als etwa 60 bis 100 mm, weil der Harn sonst sehr stark schäumt und stößt.

Der eingeengte Harn wird jetzt mit oder ohne Zusatz von Ammoniumsulfat, aber unter Zusatz von 50% Phosphor- oder Schwefelsäure im Lindtschen Apparat einer 24stündigen Extraktion unterworfen. Der Ätherextrakt wird nun nach Zusatz von ammoniakhaltigem Wasser auf dem Wasserbade sehr stark eingeengt (von etwa 50 ccm Wasser auf 20), wodurch bereits der Äther fast vollständig verjagt wird und ebenso das überschüssige Ammoniak. Der Rückstand wird nun in den Milchsäureapparat gebracht, dann werden etwa 300 ccm verdünnter Schwefelsäure (Reaktion muß jetzt stark sauer sein und geprüft werden) zugesetzt und nun unter starker Flamme, ohne noch Permanganat zuzusetzen, etwa 200 ccm abdestilliert. Hieran schließt sich die eigentliche Milchsäurebestimmung.

Was zunächst das Einengen des Harns im Vakuum anbetrifft, so ziehe ich diese allerdings etwas umständlichere

Vakuumdestillation dem direkten Einengen, bei dem ich vielfach Mißerfolge gehabt habe, unbedingt vor.

Zur Ätherextraktion wäre zu bemerken, daß man unbedingt gereinigten Äther anwenden muß; der gewöhnliche käufliche Schwefeläther enthält Alkohole, ferner organische Peroxyde, Ketone, Aldehyde, die alle eine Quelle von Fehlern werden können. Die Reinigung geschieht durch Schütteln mit 50°/₀ Kalilauge und Waschen bis zur neutralen Reaktion des Waschwassers. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die vollständige Entfernung des Äthers vor der Oxydation im Apparat, da der Äther, auch wenn er rein ist, sulfit- oder jodbindende Substanzen liefern kann.

Geht man aber in der geschilderten Weise vor, so kann man, wie aus folgendem Versuche hervorgeht, sicher sein, daß der Äther keine Vermehrung der Milchsäure vortäuschen wird.

200 ccm Äther werden unter Zusatz von ammoniakhaltigem Wasser auf dem Wasserbad verdampft, bis kein Äther mehr vorhanden und die Reaktion nur noch sehr schwach alkalisch ist. Diese Menge wird genau wie sonst behandelter Harn unter Zusatz von verdünnter Schwefelsäure in den Milchsäureapparat gebracht. Zuerst 200 ccm leer destilliert.

Leerdestillat zeigt:

1. keine Spur jodbindende Substanzen,
2. keine Spur bisulfitbindende Substanzen.

Titer 10 Bisulfit . .	= 15,9 Jod
Vorgel. 10 Bisulfit .	= 15,9 „
Zurücktitriert . . .	= 15,9 „
	Rest 0,0 Jod.

Nach der Oxydation mit Permanganat zeigt das Destillat folgendes Resultat:

Titer 10 Bisulfit . .	= 15,9 Jod
I. Portion.	
Vorgel. 10 Bisulfit .	= 15,9 „
Zurücktitriert . . .	= 15,8 „
	Rest 0,1 Jod.
II. Portion.	
Vorgel. 10 Bisulfit .	= 15,9 Jod
Zurücktitriert . . .	= 15,9 „
	Rest 0,0 Jod.

Also: Aus dem Äther entstehen unter den geschilderten Bedingungen weder jod- noch bisulfitbindende Substanzen.

Zum Oxydieren muß man stets ungefähr $^1/_{100}$ Permanganatlösung benutzen, wie schon von Embden angegeben.

Was die Entfernung von anderen jod- oder bisulfitbindenden Destillationsprodukten anbelangt, so bewährt sich die erwähnte Leerdestillation in allen Fällen, wie aus näherer Betrachtung der folgenden Fälle hervorgeht, vollständig. Ob aber aus anderen Substanzen des Harnes bei der Oxydation nach v. Fürth-Charnaß nicht etwa bisulfit- oder jodbindende Substanzen, die nicht der Milchsäure angehören, vorkommen, bleibt natürlich eine offene Frage, die nicht einfach, wie ich es getan, durch Anstellung der Aldehydreaktion im Destillate nach Oxydation zu lösen ist, sondern jedesmal durch vollständige Analyse des Zinksalzes der isolierten Milchsäure einwandfrei zu beweisen ist.

Allerdings wird es gewiß nicht immer gelingen, namentlich mit kleinen Mengen, das Zinksalz auch wirklich rein zu gewinnen, so daß wir vorläufig, solange wir keine solche Aldehyd- bzw. Ketonbildner vermuten, die Werte auf Milchsäure beziehen müssen.

Anschließend einige Fälle:

Fall 1. Kupka, 31 Jahre.

Diagnose: Abgelaufene Pneumonie.
Harn: Normal.
Menge: 1200 ccm.
I. Portion: 500 ccm ohne Zusatz.
II. " : 500 ccm + 25 ccm einer Milchsäure-Lith.-Lösung, die 0,236 g Milchsäure enthält, verarbeitet nach der beschriebenen Methode.
Berechnung:

1. Portion:
Titer 30 Bisulfit . . . . . . = 48,6 Jod
Vorgel. 2 × 30 Bisulfit . . . = 97,2 "
Zurücktitriert 44,4 + 44,3 Jod = 88,7 "
Rest 8,5 Jod
× Faktor 0,005
also 0,0425 g Milchsäure in 500 ccm.

Im Tagesharn also 0,1020 g Milchsäure.

2. Portion (Kontrolle), 500 + 25 ccm Lösung:
Titer 30 Bisulfit . . . . . . = 48,6 Jod
Vorgel. 2 × 30 Bisulfit . . . = 97,2 "
Zurücktitriert 21,2 + 21,0 Jod = 42,2 "
Rest 55,0 Jod
× Faktor 0,005
also 0,275 g Milchsäure

Zugesetzt 0,236 g, und in der 1. Portion dieses Harnes gefunden 0,042 g Milchsäure.

Zu finden sind 0,2785 g.

Gefunden 0,275 g.

Also quantitativ!

Fall 2. Haussner, 48 Jahre.

Diagnose: Hämatochromatose.

Harn: Albumin 0. Enthält Gallenfarbstoff.

Menge: 1800 ccm.

1. Portion, 500 ccm ohne Zusatz, eingeengt im Vakuum usw.:

Titer 30 Bisulfit . . . . . . = 22,2 Jod
Vorgel. 2 × 30 Bisulfit . . . = 44,4 „
Zurücktitriert 17,0 + 17,0 Jod = 34,0 „
Rest 10,4 Jod
× Faktor 0,005
also 0,0520 g Milchsäure in 500 ccm.

Im Tagesharn also 0,1872 g Milchsäure.

2. Portion (Kontrolle), 500 ccm + 25 ccm Lösung = 0,236 g Milchsäure.

Titer 50 Bisulfit . . . . . . = 80,4 Jod
Vorgel. 2 × 50 Bisulfit . . . = 160,8 „
Zurücktitriert 52,4 + 52,6 Jod = 105,0 „
Rest 55,8 Jod
× Faktor 0,005
also 0,2790 g Milchsäure.

Auch hier ein genügend genaues Resultat.

Fall 3. Adam, 20 Jahre.

Diagnose: Diabetes mellitus.

Urin: 4,3 % Zucker, Albumin 0, Aceton 0, Acetessigsäure 0, Oxybuttersäure fehlt.

Tagesmenge: 4600 ccm.

1000 ccm eingeengt auf 150 ccm.

Menge des Abdampfrückstandes: 15 ccm.

Verarbeitete Hälfte: 7,5 ccm.

Vorgel. 50 Bisulfit . . . . . = 80,5 Jod
Zurücktitriert . . . . = 77,4 „
Rest 3,1 Jod
also doppelt 6,2 „
× Faktor 0,005
also 0,031 g Milchsäure in 1000 ccm.

Im Tagesharn also 0,1426 g Milchsäure!

Andere Hälfte. Der nach Entfärbung mit Tierkohle filtrierte Ätherextrakt zeigt keine Linksdrehung, also keine Oxybuttersäure. Ob Oxybuttersäure in anderen Fällen Milchsäure vortäuschen kann (etwa durch Ketonbildung und Sulfitbindung) ist noch zu untersuchen.

Fall 4. Wittwer, 38 Jahre.

Diagnose: Nephritis.
Urin: 4‰ Albumin.
Menge: 1400 ccm.
Der Harn wurde zuerst enteiweißt, sodann wie früher verarbeitet.

1. Portion, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 20 Bisulfit . . . . . . = 31,4 Jod
Vorgel. 2 × 20 Bisulfit . . . = 62,8 „
Zurücktitriert 30,0 + 29,6 Jod = 59,6 „
Rest 3,2 Jod
× Faktor 0,005
also 0,0160 g Milchsäure.

Mit stärkerer Permanganatlösung, kürzer oxydiert, wodurch bekanntlich Überoxydation zu Essigsäure statt Aldehyd vorkommen kann.

2. Portion, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 20 Bisulfit . . . . . . = 31,4 Jod
Vorgel. 2 × 20 Bisulfit . . . = 62,8 „
Zurücktitriert 29,2 + 29,4 Jod = 58,6 „
Rest 4,2 Jod
× Faktor 0,005
also 0,0210 g Milchsäure.

Mittel also 0,0185 g in 500 ccm = 0,0516 g Milchsäure im Tagesharn.

Fall 5. Damesch, 50 Jahre.

Diagnose: Mechanischer Leberabschluß. Ikterus.
Urin: Dunkelbraun. Albumin 0.
Menge: 2100 ccm.

1. Portion, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 50 Bisulfit . . . . . . = 80,4 Jod
Vorgel. 50 Bisulfit . . . . . = 80,4 „
Zurücktitriert . . . . = 57,1 „
Rest 23,3 Jod
× Faktor 0,005
also 0,1165 g Milchsäure in 500 ccm.

Im Tagesharn also 0,4893 g Milchsäure.

Fall 6. Gärtner, 31 Jahre.

Diagnose: Perniciöse Anämie.
Urin: Albumin 0.
Menge: 1200 ccm.

1. Portion, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 20 Bisulfit . . . . . . = 30,7 Jod
Vorgel. 2 × 20 Bisulfit . . . = 61,4 „
Zurücktitriert 27,7 + 27,8 Jod = 55,5 „

Rest 5,9 Jod
× Faktor 0,005

also 0,0295 g Milchsäure.

Also im Tagesharn 0,0708 g Milchsäure.

Fall 7. Resnisek, 42 Jahre.

Diagnose: Perniciöse Anämie.
Urin: Albumin 0.
Menge: 1100 ccm.

1. Portion, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 20 Bisulfit . . . . . . = 31,1 Jod
Vorgel. 2 × 20 Bisulfit . . . = 62,2 „
Zurücktitriert 26,1 + 26,1 Jod = 52,2 „

Rest 10,0 Jod
× Faktor 0,005

also 0,05 g Milchsäure.

Kontrolle, 500 ccm ohne Zusatz:

Titer 20 Bisulfit . . . . . . = 31,1 Jod
Vorgel. 2 × 20 Bisulfit . . . = 62,2 „
Zurücktitriert 26,0 + 26,0 Jod = 52,0 „

Rest 10,2 Jod
× Faktor 0,05

also 0,51 g Milchsäure.

Also im Tagesharn 0,11 g Milchsäure.

Aus diesen Versuchen mit durchwegs gut stimmenden Kontrollanalysen geht zur Genüge hervor, daß die hier mitgeteilte Methode zur Bestimmung der Milchsäure im Harn ihrem Zweck genügend entspricht. Allerdings wird man in Fällen, wo Zweifel über die Art der bisulfitbindenden Substanzen am Platze sind, gut tun, die Milchsäure als Zinksalz zu isolieren und zu analysieren.

Ist es möglich, den Gehalt des Gehirns an Phosphatiden zu steigern?

Von

E. Salkowski.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Institus der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. Mai 1913.)

Daß Erkrankungen des Gehirns bzw. an solchen Geisteskrankheiten, deren anatomisches Substrat man bereits kennt, von Änderungen der Zusammensetzung des Gehirns begleitet sind, hat man a priori von jeher als wahrscheinlich angenommen. In neuester Zeit haben Carbone und Pighini[1]) angegeben, daß in dem Gehirn der an progressiver Paralyse Verstorbenen der Gehalt an Kephalin erheblich — etwa bis auf die Hälfte — vermindert sei. Man ist danach berechtigt, an die Möglichkeit einer entsprechenden Therapie des Gehirns zu denken. Und die Berechtigung dieser Annahme würde wachsen, wenn es gelänge, von bekannten Hirnbestandteilen durch Tierversuche nachzuweisen, daß sie unzersetzt resorbiert und unter günstigen Bedingungen im Gehirn angesetzt werden können. Im Vordergrund des Interesses stehen dabei die Phosphatide und von diesen wiederum die bisher am besten bekannten, das Lecithin und das Kephalin.

Vom Lecithin aus Eidotter ist es bekannt, daß es unverändert resorbiert wird, bezüglich der Ablagerung desselben im Organismus hat Franchini[2]) vor etwa 6 Jahren durch auf meine Veranlassung und unter meiner Leitung angestellte Versuche an Kaninchen nachgewiesen, daß es sich in erheblicher Quantität in der Leber ablagert — hier war noch bis 14 Tage nach der Lecithinzufuhr ein erhöhter Gehalt an Lecithin nach-

[1]) Diese Zeitschr. 46, 451 bzw. 467. Die Autoren sprechen von 5 Fällen, in denen diese Tatsache festgestellt sei, in der Tabelle finde ich aber nur 4, während ein Fall der Herabsetzung sich auf Dementia praecox bezieht und in einem Falle von progressiver Paralyse sich keine Verminderung fand. Es mögen noch mancherlei andere Angaben hierüber in der psychiatrischen Literatur vorhanden sein, diese aber entzieht sich meiner Kenntnis.

[2]) Diese Zeitschr. 6, 211, 1907.

weisbar. Für das Gehirn gelang uns dieser Nachweis aber nicht, die Versuche hatten vielmehr ein entschieden negatives Resultat. Nun ist dagegen allerdings zu sagen, daß die Identität des Lecithins aus Eidotter mit dem aus dem Gehirn keineswegs als erwiesen anzusehen ist. Ja, nach den Untersuchungen von Sigmund Fränkel[1]) enthält das menschliche Gehirn überhaupt kein Lecithin, sondern ein Phosphatid von abweichenden Eigenschaften — ein Triaminodiphosphatid —, dem Fränkel den Namen „Sahidin" gegeben hat. Es ist ferner einzuwenden, daß negative Resultate überhaupt nicht voll beweisend sind: Man kann sich wohl vorstellen, daß ein Organ von normaler Zusammensetzung sich keinen einzelnen Bestandteil willkürlich aufdrängen läßt, durch den es ja in seiner normalen Zusammensetzung geändert, abnorm werden würde! Wir haben damals den Lecithingehalt des Gehirns hungernder Tiere verglichen — mit und ohne Lecithinzufuhr; vielleicht war diese Anordnung nicht zweckentsprechend, es ließen sich ja noch andere Versuchsanordnungen denken, die vielleicht erfolgreich gewesen sein würden; auf diesen Punkt möchte ich hier aber nicht eingehen, da tatsächlich nur das angegebene Versuchsmaterial vorliegt.

Über das Kephalin liegen meines Wissens keine Versuche nach dieser Richtung hin vor. Nun stand bis vor kurzem der Begriff des Kephalins ja allerdings auch nicht vollkommen fest, es war aber doch immer zunächst sehr beachtenswert, daß die von verschiedenen Forschern angegebene elementare Zusammensetzung eine große Übereinstimmung zeigt, wie aus nachfolgender Zusammenstellung in Prozenten hervorgeht.

C	H	N	P	Untersucher
60,00	9,38	1,68	4,27	Thudichum[2])
59,50	9,80	1,75	3,83	Koch[2])
—	—	1,84	3,81	Cousin[2])
60,20	9,80	3,80	2,60	Zülzer[3])
59,68	9,74	1,57	3,64	Stern u. Thierfelder[4])
62,05	9,85	1,69	3,45	Neubauer[5]).

[1]) Diese Zeitschr. 24, 268.

[2]) Thierfelder, Handb. d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, 8. Aufl., S. 198.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 263.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 381. Aus Eidotter neben Lecithin erhalten.

[5]) Diese Zeitschr. 21, 335.

Wenn man nun auch auf die nahe Übereinstimmung der Zusammensetzung der von verschiedenen Forschern dargestellten Kephalinpräparate[1]) in Anbetracht des Umstandes, daß das Gehirn eine Reihe von Phosphatiden enthält, deren Trennung sehr schwierig, zum Teil überhaupt noch nicht gelungen ist, wenn man in Anbetracht dieses Umstandes auf die große Annäherung der Zahlen auch nicht allzu viel Wert legen darf, so bleibt sie doch immer sehr bemerkenswert. Durch die verdienstvollen Arbeiten von S. Fränkel und E. Neubauer[2]) ist nun aber jeder Zweifel an der chemischen Individualität des Kephalins gehoben: es ist eine vollkommen gut charakterisierte Substanz. Nach dieser Richtung wären also für die Versuche an Tieren keine prinzipiellen Schwierigkeiten mehr vorhanden, eine große praktische Schwierigkeit aber liegt in der Beschaffung so großer Mengen von Material, wie sie zu den Tierversuchen erforderlich sind. Unter diesen Umständen habe ich geglaubt, mich vorläufig eines mir von der Firma Blattmann & Co. in Wädenswil angebotenen Materials bedienen zu dürfen, das jedenfalls zum großen Teil aus Kephalin besteht[3]).

Das mir zur Verfügung gestellte Rohkephalin stellt eine bräunliche wachsartige Masse dar, mit deutlichem Geruch nach den bei der Darstellung angewendeten Lösungsmitteln. Bezüglich der Löslichkeitsverhältnisse (kleine Proben im Reagensglas mit dem Lösungsmittel erwärmt) wurde folgendes festgestellt:

1. Alkohol: fast ganz unlöslich,
2. Aceton: fast ganz unlöslich,
3. Äther: langsame und nicht ganz vollständige Lösung,
4. Benzol: vollständige Lösung.
5. Gleiche Teile Benzol und Alkohol absolutus: vollständige Lösung.

Bei der wachsartigen Beschaffenheit erfolgte die Lösung (wo sie überhaupt stattfand) nur allmählich. Beim Erhitzen auf dem Platinblech verbrennt die Substanz mit leuchtender Flamme, hinterläßt Kohle, die allmählich verbrennt, anscheinend ohne Asche zu lassen.

[1]) Nur Zülzers Kephalin weicht, wenigstens im Stickstoff- und Phosphorgehalt, wesentlich ab. Zülzer hat augenscheinlich einen anderen Körper in Händen gehabt. Trotzdem stimmen seine Zahlen für C und H überein. Unzweifelhaft liegt in diesem Umstand die Mahnung, auf die Elementarzusammensetzung nicht allzu großen Wert zu legen.

[2]) Diese Zeitschr. 21, 321.

[3]) Nach brieflicher Mitteilung stellt die genannte Fabrik jetzt ein in Äther ganz lösliches Präparat mit 2,8 bis 3,0 % P dar (Phosphosan genannt).

Bestimmt wurde der Wassergehalt bzw. Gewichtsverlust bei 110°, Aschengehalt, P und N.

Analysen.

1. 0,9170 g verloren beim Trocknen 0,0688 g = 7,50%, gaben beim Veraschen, das sehr langsam erfolgte, 0,0580 g = 6,61% glasige Asche, die sich langsam mit stark saurer Reaktion in Wasser löste. (Der Prozentgehalt kommt dem Gehalt an Phosphor berechnet als Phosphorsäure [P_2O_5] nahe, so daß die Substanz nur ca. 1% Asche enthalten dürfte.)

2. 0,5248 g wurden zur Bestimmung des P-Gehalts in einer Platinschale abgewogen, durch Übergießen mit Benzol unter vorsichtigem Erwärmen auf dem Wasserbad in Lösung gebracht, die Lösung bis auf einige Kubikzentimeter verdampft, dann soviel Salpetermischung — etwa 25 g — aufgeschüttet, daß die Flüssigkeit vollständig aufgesogen erschien. Die Mischung wurde auf dem Wasserbad bis zum Verschwinden des Benzolgeruchs vollständig getrocknet, dann vorsichtig geschmolzen, in der Schmelze die Phosphorsäure in der üblichen Weise nach vorgängiger Fällung mit Molybdänlösung als $Mg_2P_2O_7$ bestimmt. Das umständliche Verfahren wurde eingeschlagen, weil sich auf anderem Wege eine gleichmäßige Mischung des Kephalins mit Salpetermischung, die durchaus erforderlich ist, nicht herbeiführen läßt.

Es wurden 0,0430 g $Mg_2P_2O_7$ erhalten = 5,24% P_2O_5 resp. 2,29% P der lufttrockenen Substanz, 2,48% der Trockensubstanz.

3. Die Bestimmung der Trockensubstanz und des Phosphorgehaltes wurde wiederholt, jedoch mit einer Modifikation. Da es mir bei der wachsartigen Konsistenz der Substanz zweifelhaft war, ob sie als solche vollständig getrocknet werden könne, wurde sie diesmal in der Platinschale in Benzol gelöst, vorsichtig verdampft und dann getrocknet. Der erhaltene Wert war diesmal etwas höher.

0,7044 g verloren 0,0578 g = 8,22%. — 0,7364 g gaben 0,0608 g $Mg_2P_2O_7$ = 5,28% P_2O_5 = 2,3% P für die lufttrockene Substanz, 2,51% für die trockene Substanz[1]).

---

[1]) Es wurde diesmal etwas anders verfahren. Die abgewogene Substanz in Benzol gelöst, die Lösung vollständig in einen Kolben übertragen, das Benzol abdestilliert und der Rückstand mit rauchender Salpetersäure oxydiert, überneutralisiert, unter Zusatz von Salpetermischung geschmolzen.

4. N-Bestimmung nach Kjeldahl:

1. 0,6008 g. 10 ccm $^{n}/_{5}$-Säure vorgelegt, mit $^{n}/_{10}$-Lauge zurücktitriert. Gebraucht 11,05 ccm = 2,14 % N.
2. 0,6320 g. 10 ccm $^{n}/_{5}$-Säure; gebraucht 11,1 ccm $^{n}/_{10}$-Lauge = 1,99 % N.

Nach den Löslichkeitsverhältnissen und dem Phosphorgehalt ist man wohl berechtigt, die in Rede stehende Substanz als Rohkephalin zu bezeichnen.

Allgemeine Anordnung der Versuche.

Als Versuchstiere dienten vorläufig nur Kaninchen, schon aus dem Grunde, weil Franchini zu seinen negativ ausgefallenen Versuchen mit Lecithin auch nur solche benutzt hat. Ein etwaiges abweichendes Verhalten des Kephalins gegenüber dem Lecithin mußte unter diesen Umständen um so beweisender erscheinen. Auch die Versuchsanordnung schloß sich an die damals von Franchini auf meine Veranlassung angewendete an, nur mit dem Unterschied, daß die Kaninchen 4 Tage Kephalin erhielten, bei Franchini nur 3 Tage Lecithin. Die Kaninchen erhielten kein Futter, nur am 3. und 4. Tage Wasser vorgesetzt, von dem sie mehr oder weniger zu sich nahmen (an den ersten Tagen verschmähten sie meistens Wasser). Täglich erhielten die Versuchstiere 2 g Kephalin, im ganzen also 8 g, die Kontrollkaninchen nur Wasser. Versuchskaninchen und Kontrollkaninchen wechselten regelmäßig ab. Den Hungerzustand wählte ich in der Vorstellung, daß bei diesem am ehesten ein Unterschied im Kephalingehalt zwischen Versuchskaninchen und Kontrollkaninchen zu erwarten war. Die Beibringung des Kephalins machte Schwierigkeiten. Reines Kephalin gibt nach E. Neubauer mit Wasser beim Verreiben eine Emulsion; das tut das gebrauchte Rohkephalin nicht, d. h. es gab wohl auch eine emulsionsartige Flüssigkeit, der weitaus größte Teil klebte aber an der Reibschale und dem Pistell fest, so daß es nicht möglich war, dieses Verfahren zu benutzen. In einigen Versuchen, die für die in der Überschrift gestellte Frage nicht verwertet wurden, wurde so verfahren: 2 g Kephalin wurden in einem Schälchen mit Benzol (oder auch Äther) in Lösung gebracht, dazu einige Kubikzentimeter Olivenöl gegeben, alsdann Wasser mit einem Tropfen Natriumcarbonat-

lösung, durch Verreiben eine Emulsion hergestellt, das Benzol auf dem Wasserbad verjagt. Man erhält so, wenn auch ziemlich mühselig, eine weißliche rahmartige Flüssigkeit, die sich mit der Schlundsonde bequem in den Magen bringen ließ. Offenbar ist diese Form der Darreichung die günstigste für die Resorption, sie wurde aber verlassen, da die Kaninchen das Öl nicht zu vertragen schienen. Wenigstens ist ein Kontrollkaninchen gestorben, das betreffende Kephalinkaninchen nicht. Da es sich auch darum handelte, festzustellen, ob bei Verabreichung von Kephalin keine Darmstörungen eintreten, so mußte diese Art der Verabreichung, die ein Moment der Unsicherheit in die Versuche hineingetragen hätte, aufgegeben und die Einführung in Pillenform gewählt werden. Bei der physikalischen Beschaffenheit des Kephalins lag diese Form am nächsten, sie wurde nur darum nicht gleich anfangs gewählt, weil ich fürchtete, daß das Kephalin in dieser Form nicht so gut resorbiert werden würde. Ganz unbegründet erwies sich diese Befürchtung auch nicht. Die Pillen ließen sich direkt aus dem Präparat ohne jeden Zusatz auf dem Pillenbrett herstellen, sie wurden nur mit etwas Pulvis Liq. bestreut. Aus 8 g Kephalin ergaben sich 40 bis 46 Pillen, die im Laufe von 4 Tagen verfüttert wurden. Auch die Beibringung der Pillen ist nicht ganz einfach und ziemlich mühselig. Ich verfuhr so: Dem Kaninchen wurde eine Metallröhre, die die Pillen leicht passieren ließ, über die Zunge in den Pharynx eingeführt, dann ließ ich 3 bis 4 Pillen durch die Metallröhre hinablaufen, entfernte diese schnell und hielt dem Kaninchen Nase und Mund zu, bis es die Pillen verschluckt hatte. Später gelang die Verfütterung der Pillen auch ohne die Metallröhre; allerdings wurden auch öfter Pillen herausbefördert und mußten dann aufs neue gegeben werden.

Nach Ablauf von 4 mal 24 Stunden nach dem Beginn des Versuchs, d. h. nach Isolierung des betreffenden Kaninchens und Entziehung des Futters, wurden die Tiere durch Verbluten getötet, das Gehirn, die Leber, öfters auch Darminhalt, zur Untersuchung genommen, in einem Fall auch der Mageninhalt. Bei einem Teil der Versuche wurde auch der Harn während des Lebens gesammelt und mit dem bei der Sektion aus der Blase erhaltenen vereinigt.

Zu den Untersuchungsmethoden.

Es fragt sich, wie man eine etwaige Zunahme des Kephalins feststellen sollte. Als der einzige gegebene Weg erschien mir die Bestimmung des Gesamtgehaltes an Phosphatiden, da der Versuch einer isolierten Bestimmung der Kephalinfraktion bei der Kleinheit des Gehirnes zu geringe Chancen für das Gelingen bot[1]). Als „Phosphatid" betrachtete ich die in Benzol lösliche Substanz, die Untersuchung kam also auf die Bestimmung des Phosphorgehaltes der in Benzol löslichen Substanz hinaus. Selbstverständlich hätte es keinen Sinn gehabt, das Gehirn direkt mit Benzol zu behandeln. Es wurde vielmehr folgendermaßen verfahren:

Untersuchung des Gehirns.

Das Gehirn wurde zunächst nach Entfernung anhaftender Blutkoagula und Abdrücken mit Filtrierpapier gewogen, dann mit Alkohol absolutus verrieben, und zwar entweder direkt oder nachdem es vorher in toto 1 bis 2 Tage in Alkohol absolutus gelegen hatte. Im letzteren Falle mußte Zerschneiden mit der Schere zu Hilfe genommen werden. Die ganze Masse wurde unter sorgfältiger Vermeidung von Verlusten mit Alkohol in ein Erlenmeyer-Kölbchen übertragen — das Volumen betrug im ganzen etwa 250 ccm — und in diesem etwa 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht, wobei manchmal unangenehmes Stoßen eintrat. Der alkoholische Auszug wurde durch ein Filter abgegossen, das Kölbchen mehrmals mit Alkohol absolutus ausgespült, der Alkohol durch dasselbe Filter gegossen. In manchen Fällen gelang dies nicht gut, so daß ein erheblicher Teil des Rückstandes auf das Filter gelangte. Der mit Alkohol extrahierte Gehirnrückstand wurde nun wieder vollständig in dem Extraktionskölbchen vereinigt, mit etwa 200 ccm eines Gemisches gleicher Volumina Alkohol absolutus und Benzol 3 bis $3^1/_2$ Stunden gekocht, dann durch das früher benutzte, inzwischen aufbewahrte Filter filtriert, mehrmals mit dem erwähnten Gemisch warm nachgegossen, schließlich das Filter zwischen 2 Glasplatten abgepreßt[2]).

---

[1]) In einigen Vorversuchen hat übrigens Herr Dr. F. Reich, der sich anfangs an den Versuchen beteiligte, diesen Weg einzuschlagen versucht; er erwies sich aber aus verschiedenen Gründen unzweckmäßig.

[2]) Der Rückstand bildet eine weiße, an einzelnen Stellen durch mit koaguliertem Blut gefüllte Gefäßreste bräunlich gefärbte Masse, die sich in der Reibschale sehr leicht zu einem staubfeinen Pulver verreiben läßt.

Es waren nun also zwei Filtrate vorhanden, ein alkoholisches I und ein alkoholisch-benzolisches II, die jedes für sich langsam auf dem Wasserbad verdampft wurden. Der beim Verdunsten des Filtrates gebliebene Rückstand wurde noch warm in Benzol gelöst, was unter wiederholtem Umschwenken, wenn auch nur langsam, gelang; es blieb nur ein minimaler, beim Umgießen fest an der Schale haftender Hauch ungelöst. Die Lösung wurde in eine größere Platinschale gegossen, die Schale mit Benzol nachgespült. Das Filtrat II war ebenso behandelt, die Benzollösung in dieselbe Platinschale gegossen, deren Inhalt inzwischen durch Erwärmen auf dem Wasserbad verringert war. Die Benzollösung wurde durch gelindes Erwärmen bis auf wenige Kubikzentimeter eingedampft, dann so viel Salpetermischung (ca. 25 bis 30 g) in die Platinschale geschüttet, daß die Flüssigkeit vollständig verschwand, nunmehr so weiter verfahren, wie ich bei der P-Bestimmung des Kephalins angegeben habe. Man wird sich wundern, daß ich diese so einfachen Prozeduren so umständlich beschreibe, es kommt tatsächlich sehr viel auf die genaue Ausführung an. Filtrieren der stark eingeengten Benzollösungen ist durchaus zu vermeiden; ich halte es für unmöglich, Verluste dabei ganz auszuschließen, um so mehr, als die Filtration, wie ich mich durch einen verlorenen Versuch überzeugte, bald sehr zögernd wird, ja selbst ganz stockt.

Es fragt sich nun, ob das Verfahren ausreichend genau ist. Um dies festzustellen, wurde der durch freiwillige Verdunstung an der Luft erhaltene Gehirnrückstand unter möglichster Vermeidung von Verlusten 13 Stunden lang im Soxhlet-Apparat extrahiert. Um ein ergiebiges Sieden der Alkohol-Benzolmischung zu erzielen, war es nötig, den Kolben direkt in das siedende Wasserbad zu versenken. Die weitere Behandlung war dann wie oben angegeben. Bei der Fällung mit Molybdänlösung und Ammoniumnitrat wurde nur ein minimaler gelber Hauch erhalten. Die weitere Verarbeitung lieferte dann einen Glührückstand von 0,0007 g, der wenigstens zum Teil wie $Mg_2P_2O_7$ aussah, zum Teil schwärzliche, am Boden des Platintiegels fest angeschmolzene Körnchen bildete, deren Natur ich dahingestellt lassen muß. Jedenfalls konnte ich mich bei dem Ergebnis beruhigen.

Untersuchung der Leber.

Die Leber wurde nach Entfernung der Gallenblase mit Filtrierpapier abgetupft, gewogen, gehackt, von dem Brei unter möglichster Vermeidung der großen Gefäße und häutigen Teile ein ca. 10 g betragendes Quantum in einer Platinschale genau gewogen, mit Alkohol absolutus vollständig in einen breiten, niedrigen, mit Glasstöpsel versehenen Zylinder gebracht, in dem Alkohol, von dem noch eine weitere Quantität hinzugefügt wurde, möglichst verteilt und 1 bis 2 Tage stehen gelassen. Dies geschah, um das weitere Hantieren mit dem Material zu erleichtern. Die weitere Verarbeitung geschah dann genau so wie beim Gehirn. Ein Unterschied machte sich konstant bemerkbar. Beim Lösen des beim Verdunsten von Filtrat I gebliebenen Rückstandes in Benzol blieb weit mehr Rückstand ungelöst als beim Gehirn. Das Ungelöste haftete indessen als gelblicher Überzug so fest an der Schale, daß sich die Benzollösung abgießen ließ. Filtrieren wurde auch hier vermieden. Der Rückstand löste sich spielend leicht in Wasser, gab angesäuert mit Phosphorwolframsäure einen Niederschlag, gab jedoch keine Biuretreaktion, und auch aus dem Phosphorwolframsäure-Niederschlag war eine solche nicht zu erhalten.

Auch für die Leber mußte die Frage beantwortet werden, ob das eingeschlagene Verfahren ausreichend genau ist. Unerwarteterweise ergab sich, daß das nicht der Fall ist, allerdings ist die Untersuchung nur einmal ausgeführt, und zwar nach demselben Verfahren wie beim Gehirn. Die Soxhletextraktion ergab noch 0,0052 $Mg_2P_2O_7$ gegenüber ursprünglich erhaltenen 0,0675 g. Das Defizit ist nicht unbeträchtlich: es beträgt auf die Summe bezogen 7,1 $^0/_0$. Da aber gerade in diesem Falle der P-Gehalt niedriger gefunden wurde als sonst und außerdem auf den P-Gehalt in der Leber, wie sich zeigen wird, überhaupt kein Wert zu legen ist, so glaubte ich die ohne diese Korrektur angestellten Versuche nicht verwerfen zu sollen. Der Gleichmäßigkeit wegen habe ich auch in dem vorliegenden Falle die nachträglich noch gefundene Quantität $Mg_2P_2O_7$ bei Berechnung nicht verwertet.

Untersuchung des Darminhaltes und der Faeces.

Das Verfahren war dasselbe wie bei Leber und Gehirn, nur bei dem ersten Versuch (Vorversuch) etwas abweichend.

Die Abweichung geht aus dem unten mitgeteilten Protokoll hervor.

Untersuchung des Harns.

Es wurde Stickstoff und Phosphorsäure bestimmt. Die Titrierung mit Uran erwies sich, vielleicht infolge der dunklen Färbung, welche der Harn durch Einwirkung der zum Konservieren zugesetzten Salzsäure angenommen hatte — natürlich wurde die abgemessene Quantität vorher neutralisiert —, als unausführbar: es war kein einigermaßen scharfer Endpunkt festzustellen, auch das Verfahren der Ausfällung der Phosphate durch Zusatz von NH_3 und Magnesiamischung, Lösen des gewaschenen Niederschlages in Essigsäure und Titrieren dieser Lösung befriedigte mich nicht. Der Sicherheit wegen wählte ich das gewichtsanalytische Verfahren. Aus 25 resp. 50 ccm des erst neutralisierten, dann essigsauer gemachten Harns wurde das Calcium durch Zusatz von Ammoniumoxalat ausgefällt, am nächsten Tage abfiltriert und nachgewaschen, das Filtrat mit Magnesiamischung und Ammoniak versetzt usw. Es war auffallend, wie schwer das $Mg_2P_2O_7$ durch Glühen ganz weiß zu erhalten war, vollständig erst mit einigen Tröpfchen Salpetersäure, Abdampfen und erneutes Glühen, im Gegensatz zu dem $Mg_2P_2O_7$ aus den Schmelzen, das nach etwa 12 bis 15 Minuten langem Glühen auf dem Gebläse schneeweiß erhalten wurde. Für den menschlichen Harn habe ich[1]) nachgewiesen, daß das Ammonmagnesiumphosphat stets Harnsäureverbindungen, namentlich Ammonsalz enthält, augenscheinlich ist auch hier eine Beimischung von organischer Substanz vorhanden.

Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß in einem Falle der als Calciumoxalat anzusprechende Niederschlag eine auffallend großkrystallinische Beschaffenheit hatte, auch an Menge weit größer war, als gewöhnlich. Es war nicht daran zu zweifeln, daß er aus $MgNH_4PO_4$ bestand, das sich infolge ungenügend saurer Reaktion abgeschieden hatte. Der Niederschlag wurde daher nach dem Abgießen des Harns nochmals in wenig Salzsäure gelöst. Durch Zusatz von Ammoniak und Essigsäure gefällt und abfiltriert. Ich erwähne dieses Vorkommnis, weil es leicht zu Irrtümern Veranlassung geben kann.

Ich gehe nunmehr zur Mitteilung der Versuchsprotokolle über. Leider verfüge ich nur über sechs vollständig gleich-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 157.

mäßig nach dem angegebenen Verfahren und ohne Zwischenfall verlaufene Versuche[1]). Einige vorher von Dr. F. Reich bzw. zusammen mit diesem angestellte Versuche müssen hier aus verschiedenen Gründen außer Betracht bleiben. Es sei nur ein Vorversuch betreffs der Vollständigkeit der Resorption mitgeteilt. Die Fütterung mit 8 g Kephalin in Emulsionsform mit der Schlundsonde wurde in diesem Falle von Dr. Reich ausgeführt, die Untersuchung des Darminhaltes von mir.

Vorversuch.

Die Faeces eines Kephalinkaninchens im Gewicht von 29 g wurden lufttrocken mit Alkohol absolutus verrieben — ca. 300 ccm —, dann 3 Stunden am Rückflußkühler gekocht, filtriert, eingedampft. Die stark eingeengte Flüssigkeit mit dem gleichen Volumen Äther versetzt und stehen gelassen zur Abscheidung etwa vorhandener löslicher phosphorsaurer Salze, dann filtriert: Filtrat I. Die rückständigen Faeces wurden bei Zimmertemperatur mit Äther extrahiert, filtriert, der Äther bis auf ein kleines Volumen abdestilliert, mit Filtrat I vereinigt und mit Äther auf 50 ccm aufgefüllt. 25 ccm gaben mit Salpetermischung geschmolzen usw. 0,0038 $Mg_2P_2O_7$, also die ganze Quantität 0,0076 g.

Der Darminhalt, durch Stehenlassen getrocknet, gleich 22 g wurde ebenso behandelt. Die ätherisch-alkoholische Mischung war zufällig einige Zeit stehen geblieben. Dabei hatte sich eine weiche Masse ausgeschieden. Es wurde filtriert. Die Masse löste sich fast ganz in Benzol. Die Benzollösung lieferte 0,0014 $Mg_2P_2O_7$, die Ätherlösung[2]) 0,0084 $Mg_2P_2O_7$, im ganzen wurden also erhalten 0,0174 $Mg_2P_2O_7$.

Mit dem Kontrolltier wurde ebenso verfahren. Die Faeces gaben bei der Fällung mit Molybdänlösung nur einen ganz minimalen gelblichen Hauch, so daß die weitere Bearbeitung nicht lohnte. Aus dem eingetrockneten Darminhalt, der zufällig fast genau ebensoviel wog, wurden 0,0052 $Mg_2P_2O_7$ erhalten, auf die Kephalinfütterung sind also nur 0,0122 $Mg_2P_2O_7$ zu beziehen. Die verfütterte Quantität Kephalin würde nach Versuch 1 0,655 g geliefert haben, das Kephalin ist also bis auf einen unbedeutenden Bruchteil resorbiert.

Versuch 1. Kontrolltier.

Kaninchen von 2180 g Anfangsgewicht, nach 4 tägigem Hungern getötet.

Lebergewicht 55,1 g, Gehirn 8,997 g. 10,4896 g Leber liefern 0,0657 $Mg_2P_2O_7$, also die ganze Leber 0,3451 g = 96,4 mg P.

100 g Leber 0,6263 $Mg_2P_2O_7$ = 174 mg P.

Das Gehirn lieferte 0,0666 $Mg_2P_2O_7$ = 18,56 mg P.

100 g Gehirn 0,7492 $Mg_2P_2O_7$ = 206,8 mg P.

---

[1]) Ein kleiner Verlust hat bei einem Kephalinversuch doch stattgefunden, siehe die Protokolle.

[2]) Es wurde die ganze Lösung verarbeitet.

Versuch 2. Kephalinversuch.

Kaninchen von 2150 g[1]), 8 g Kephalin in 4 Tagen bei Hunger (siehe allgemeine Versuchsanordnung). Leber 44,7 g, Gehirn 10,3 g.

Aus 12,209 g Leber erhalten 0,0867 $Mg_2P_2O_7$, aus der ganzen Leber 0,3174 $Mg_2P_2O_7$ = 88,6 mg P.

Aus 100 g Leber 0,7101 $Mg_2P_2O_7$ = 198 mg P.

Aus dem Gehirn 0,0822 $Mg_2P_2O_7$ = 22,98 mg P.

Aus 100 g Gehirn 0,7981 $Mg_2P_2O_7$ = 223,0 mg P.

Leider hat beim Auskochen des Gehirns mit Alkohol am Rückflußkühler etwas Verlust durch Stoßen stattgefunden. Es wurde etwas Gehirnsubstanz in den Kühler geschleudert. Dieser Anteil wurde zwar so gut wie möglich herausgebracht und weiter extrahiert, es ist aber trotzdem nicht zweifelhaft, daß die erhaltene Zahl etwas zu niedrig ist.

Die während des Versuches entleerten, an Menge sehr geringen Faeces und die im Mastdarm gefundenen Ballen mit Alkohol und Benzol behandelt usw. ergaben nur 0,0028 $Mg_2P_2O_7$, also eine ganz minimale Quantität. Der Harn wurde nur teilweise gesammelt, auf 200 ccm abgerundet:

N-Gehalt desselben 1,066 %
P_2O_5-Gehalt 0,2648 %,
Verhältnis $P_2O_5 : N = 1 : 4,02$.

Versuch 3. Kontrolltier.

Körpergewicht 1960 g. Lebergewicht 40,5 g. Gehirngewicht 9,39 g.

10,904 g Leber gaben 0,0813 $Mg_2P_2O_7$, die ganze Leber 0,302 $Mg_2P_2O_7$ = 84,4 mg P.

100 g Leber 0,7456 $Mg_2P_2O_7$ = 208,4 mg P.

Das Gehirn gab 0,0701 $Mg_2P_2O_7$ = 19,5 mg P.

100 g Gehirn gaben 0,7465 $Mg_2P_2O_7$ = 208,8 mg P.

Harn auf 300 ccm:

N-Gehalt 4,347 g

$Mg_2P_2O_7$ aus 25 ccm 0,0882 = 0,6771 P_2O_5 für die ganze Quantität. Verhältnis $P_2O_5 : N = 1 : 6,46$.

Versuch 4. Kephalintier.

Kaninchen von 1960 g, 8 g Kephalin in 4 Hungertagen in Pillenform. Lebergewicht 43,1 g. Gehirn 9,05 g[2]).

10,4674 Leber gaben 0,0622 $Mg_2P_2O_7$, die ganze Leber 0,2561 $Mg_2P_2O_7$ = 71,6 mg P.

100 g Leber 0,5942 $Mg_2P_2O_7$ = 165,8 mg P.

Das Gehirn gab 0,0758 $Mg_2P_2O_7$ = 21,1 mg P.

100 g Gehirn geben 0,8375 $Mg_2P_2O_7$ = 233,7 mg P.

Harn auf 350 ccm aufgefüllt:

N 4,5795. — $Mg_2P_2O_7$ aus 50 ccm 0,2232 g = 0,9987 P_2O_5 für die ganze Quantität. $P_2O_5 : N = 1 : 4,8$.

---

[1]) Stets zu Beginn des Versuches.

[2]) Die Differenzen in dem Gehirngewicht von annähernd gleichen Kaninchen erklären sich wohl durch die nicht ganz gleichmäßige Abtrennung und kleine Verluste.

Versuch 5. Kontrolltier.

Kaninchen von 1950 g. Leber 36,0 g. Gehirn 9,15 g.

10,3790 g Leber gaben 0,063 $Mg_2P_2O_7$, die ganze Leber 0,2005 g $Mg_2P_2O_7$ = 58,1 mg P.

100 g Leber 0,581 g $Mg_2P_2O_7$ = 164,9 mg P.

Das Gehirn gab 0,0731 g $Mg_2P_2O_7$ = 20,57 mg P.

100 g geben 0,7989 g $Mg_2P_2O_7$ = 222,8 mg P.

Harn auf 300 ccm aufgefüllt:

N-Gehalt 2,856 g. — 25 ccm gaben 0,0894 $Mg_2P_2O_7$ = 0,6863 P_2O_5 in 300 $P_2O_5 : N = 1 : 4,16$.

Versuch 6. Kephalintier.

8 g Kephalin an 4 Hungertagen als Pillen.

Körpergewicht 1870 g, Lebergewicht 47,5 g, Gehirn 7,8 g (!).

10,079 g Leber gaben 0,0675 $Mg_2P_2O_7$, die ganze Leber 0,3181 = 88,9 mg P.

100 g Leber 0,6698 $Mg_2P_2O_7$ = 186,9 mg P.

Das Gehirn gab 0,0610 $Mg_2P_2O_7$ = 17,05 g P.

100 g Gehirn geben 0,7821 $Mg_2P_2O_7$ = 218,6 mg P.

Harn auf 300 ccm aufgefüllt.

N 2,895 g — 25 ccm gaben 0,1051 $Mg_2P_2O_7$ = 0,8060 g P_2O_5 im ganzen.

Verhältnis $P_2O_5 : N = 1 : 3,49$.

Bei der Sektion zeigten sich noch stark verkleinerte Pillen im Magen, die sich durch Schlämmen von anhängenden Pflanzenfasern ohne Verlust, wenn auch nicht vollständig, befreien ließen. Ihr Gewicht betrug nach dem Trocknen (mit den noch anhängenden Pflanzenresten) 0,60 g. Sie wurden in der Platinschale mit Benzol übergossen, erwärmt, die Lösung durch Eindampfen konzentriert und ohne Berücksichtigung der Pflanzenreste mit Salpetermischung verbrannt. Es wurden erhalten 0,0151 g $Mg_2P_2O_7$, das entspricht nach der Analyse des angewendeten Kephalins 0,1831 g desselben. Der durch die ungenügende Weiterbeförderung aus dem Magen innerhalb 24 Stunden entstandene Fehler ist also sehr gering.

Der Darminhalt wurde zum größten Teil gesammelt, die Faeces dazu gegeben und auf dem Wasserbad vollständig getrocknet. Gewicht 12,7 g. Nach feinem Pulvern wurden 5,0 g mit Gemisch von Alkohol und Benzol ausgekocht usw. Es wurden erhalten: 0,0041 $Mg_2P_2O_7$, für die ganze Quantität somit 0,0104 g, entsprechend 0,1269 g Kephalin. Gegenüber 8 g verabreichtem Kephalin ist auch diese Zahl als recht gering zu bezeichnen.

Im Magen und Darm zusammen würden sich demnach 0,1831 + 0,1264 = 0,310 g unresorbiertes Kephalin befunden haben.

Welche Schlüsse lassen sich nun aus den vorstehend mitgeteilten Versuchen ziehen?

Es seien der Reihe nach besprochen:

1. die Bekömmlichkeit,
2. die Resorbierbarkeit,
3. die Ablagerung in der Leber,
4. die Ablagerung im Gehirn.

1. Die Bekömmlichkeit.

Über diesen Punkt ist am wenigsten zu sagen. Die Kaninchen, die 2 g Kephalin pro Tag, 4 Tage hintereinander, im ganzen 8 g bekommen hatten, unterschieden sich in nichts von den nur hungernden Tieren ohne Kephalin, irgendwelche Symptome wurden nicht beobachtet. Da die angewendete Menge des Kephalins etwa 1 g pro Kilo ist, besteht für die Anwendung beim Menschen jedenfalls ein sehr weiter Spielraum, wenn auch die Verabreichung einer proportionalen Quantität gar nicht in Frage käme, vermutlich schon durch den Preis ausgeschlossen wäre.

2. Die Resorbierbarkeit.

Das eingeführte Kephalin wird vom Darmkanal aus sehr leicht aufgenommen. Dies geht daraus hervor, daß sich im Darminhalt und den Faeces nach der Verfütterung nur äußerst geringe Mengen, beurteilt nach dem Gehalt an Phosphatiden, finden. Wenn auch der Darminhalt nicht ganz vollständig gesammelt ist, so wird man doch kaum fehlgehen in der Annahme, daß das Kephalin zu etwa 95 % resorbiert ist; es mag auch etwas weniger sein, jedenfalls wird die überwiegende Hauptmenge resorbiert. Für die Resorption spricht auch das Ansteigen der Phosphorsäure im Harn, sowohl absolut, als relativ zum Stickstoff.

Bei den beiden Hungertieren beträgt die P_2O_5-Ausscheidung:

$$\left.\begin{array}{r} 0{,}6671 \text{ und} \\ 0{,}6803 \end{array}\right\} \text{ im Mittel } 0{,}6717 \text{ g},$$

bei den Kephalintieren:

$$\left.\begin{array}{r} 0{,}9987 \\ 0{,}8060 \end{array}\right\} \text{ im Mittel } 0{,}9023 \text{ g},$$

also 0,2306 g mehr.

Das Verhältnis P_2O_5:N zeigte sich außerordentlich schwankend, bei den Hungertieren ohne Kephalin:

1:6,46 und
1:4,16,

so daß die Bildung einer Mittelzahl nicht wohl zulässig ist.

Bei den Kephalintieren:

1:4,02
1;4,8
1:3,49.

Ich verkenne keinen Augenblick, daß die Versuchsanordnung für die Frage der P_2O_5-Ausscheidung nicht geeignet war.

Es wird notwendig sein, die Versuche zu wiederholen und die Phosphorsäureausscheidung an einem und demselben Tier vor und nach der Fütterung festzustellen. — Die Harnuntersuchung ist auch nur beiläufig vorgenommen worden, sie war ursprünglich nicht beabsichtigt.

3. Ablagerung in der Leber?

Es ist bekannt, daß die Leber bei Kaninchen von annähernd gleichem oder doch nicht viel differierendem Körpergewicht sehr schwankende Gewichte zeigt, so daß sich eine bestimmte Relation zwischen Lebergewicht und Körpergewicht nicht aufstellen läßt. Es schien mir daher zweckmäßig, die P-Gehalte auf 100 g Leber zu berechnen. Danach betrug der benzollösliche Phosphor in 100 g Leber des Hungertieres ohne Kephalin:

174,0 — 208,4 — 164,9, im Mittel 182,4 mg.

Bei den Kephalintieren:

198 — 165,8 — 186,9, im Mittel 183,6 mg.

Eine Ablagerung von Kephalin in der Leber kann man daraus sicherlich nicht ableiten. Es ist von Interesse, damit die Zahlen zu vergleichen, die seinerzeit Franchini für den äther-alkohollöslichen Phosphor erhalten und auf Lecithin bezogen hat. Franchini hat leider in seiner Arbeit die Zahlen für P nicht mitgeteilt, sondern nur die Werte für Lecithin, die aus dem P unter der Annahme berechnet sind, daß das Lecithin 8,798 % P enthält. Als Mittelzahl von 7 Versuchen findet Franchini für die Leber des Hungerkaninchens ohne Lecithin bei sehr erheblichen individuellen Schwankungen 1,484 % Lecithin = ca. 0,130 P, also bedeutend weniger, als ich für den benzollöslichen P erhalten habe, für die Leber nach Lecithinfütterung (gleichfalls Mittel aus 7 Versuchen) 2,272 % Lecithin = ca. 200 mg P. Die Vermehrung des Lecithins scheint danach unzweifelhaft zu sein.

4. Ablagerung im Gehirn?

Auch hier schien es mir am zweckmäßigsten, den P-Gehalt auf 100 g des Organs zu beziehen. Er betrug in Milligramm:

bei den Hungertieren ohne Kephalin:

206,8—208,8—222,8, im Mittel 212,8 g;

bei den Hungertieren mit Kephalin:

223,0—233,7—218,6, im Mittel 225,1 g.

Auf das Plus von 12,3 mg P für 10 g Gehirn einen Schluß zu bauen, erscheint angesichts der großen Schwankungen in den Einzelversuchen einigermaßen gewagt, indessen, man darf nicht übersehen, daß diese Zunahme etwa 5 % des Gehaltes ausmacht. Ferner muß man sagen, daß die Aussicht, einem Organ, das seine Zusammensetzung gegenüber verschiedenen Einflüssen so hartnäckig bewahrt, wie das Gehirn, einen in ihm vorkommenden normalen Bestandteil in vermehrter Menge aufzudrängen, daß die Aussicht dafür recht gering ist.

Unter diesen Umständen kann man wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es möglich ist, Kephalin im Gehirn zur Ablagerung zu bringen, weil von diesem Gesichtspunkt aus auch eine geringfügige gefundene Zunahme nicht bedeutungslos erscheint. Jedenfalls würde nach den bisher vorliegenden Versuchen die versuchsweise Anwendung des Kephalins, das keine Störungen verursacht, bei progressiver Paralyse, ev. auch anderen Gehirnaffektionen gerechtfertigt erscheinen.

Ich verkenne keinen Augenblick die außerordentliche Lückenhaftigkeit der vorliegenden Mitteilung, allein die Versuche müssen mit äußerster Sorgfalt und Genauigkeit ausgeführt werden und sind aus diesem Grunde außerordentlich zeitraubend. Andere Aufgaben haben mich verhindert, die Zahl der Versuche zu vermehren, was unbedingt notwendig ist, wenn man zu einem sicheren Resultat kommen will. Ebenso wird es natürlich notwendig sein, die Versuche mit einem möglichst reinen Kephalin zu wiederholen.

Zusammenfassung.

1. Das käufliche Kephalin wird, per os eingeführt, gut vertragen und sowohl in der Emulsionsform wie in der Pillenform bis auf wenige Prozente resorbiert.

2. Die Phosphorsäure des Harns steigt nach Einführung desselben sowohl absolut als relativ zum Stickstoff an.

3. Das Kephalin lagert sich nicht in der Leber ab, im Gegensatz zum Eidotterlecithin nach Franchini.

4. Das Kephalin scheint sich im Gehirn abzulagern.

Über die Beziehungen der Thyreoparathyreoidektomie zum Kohlenhydratstoffwechsel.

Von

Soichiro Miura (Kioto).

(Ausgeführt unter der Leitung des a. ö. Prof. O. v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 13. Mai 1913.)

Die Bestrebungen, die Funktion der „Drüsen mit innerer Sekretion" in unmittelbare Beziehung zu den Vorgängen des intermediären Stoffwechsels zu bringen, haben im Laufe der letzten Jahre zahlreiche Untersuchungen über die Beziehung der Schilddrüse bzw. der Epithelkörper zum Kohlenhydratstoffwechsel gezeigt.

Trotzdem die Meinungen über das Verhältnis zwischen der Schilddrüse und den Epithelkörperchen noch weit auseinander gehen, empfiehlt es sich, wenn man sich den Stand dieses Problems vergegenwärtigen will, vorderhand die Schilddrüse und die Epithelkörperchen scharf auseinander zu halten.

„Was zunächst den Ausfall der Schilddrüsenfunktion betrifft", sagt Prof. O. v. Fürth[1]) in seinem Buche, „ist durch Untersuchungen an Myxödemkranken, sowie an Hunden nach Exstirpation der Schilddrüsen eine sehr merkliche Erhöhung der Zuckertoleranz beobachtet worden, die mit einer erheblichen allgemeinen Verlangsamung der Umsetzungen

[1]) O. v. Fürth, Probleme der physiol. u. pathol. Chem. 2, 306 bis 307, 1913. Vgl. dort die Literatur und ferner: Eppinger, Falta und Rudinger, Wiener klin. Wochenschr. 1908, 752. — Falta, Mitteilungen der Gesellschaft für innere Medizin in Wien 7, 102, 1908. — Underhill und Saiki, Journ. of Biol. Chem. 5, 225, 1908—1909. — Glaessner, Wiener klin. Wochenschr. 1909, 919. — Bertelli, Falta und Schweeger, Zeitschr. f. klin. Med. 71, 23, 1910. — Underhill, Centralbl. f. d. ges. Physiol. u. Pathol. des Stoffwechsels 4, 641, 1909. — Falta und Rudinger, ibid. 5, 81, 1910. — L. Morel, Les Parathyroides. 1912. — Biedl, Innere Sekretion. 1913.

einhergeht. So kann ein schilddrüsenloser Hund selbst die Verfütterung sehr großer Zuckermengen vertragen, ohne daß eine alimentäre Glucosurie sich einstellt. Auch kann bei verschiedenen Tieren nach Exstirpation der Schilddrüse unter Umständen (wenn auch keineswegs immer) die Suprareninglucosurie ausbleiben. Einen gerade entgegengesetzten Effekt hat dagegen (wie aus den Untersuchungen von R. Hirsch, Underhill und Saiki, sowie von Eppinger, Falta und Rudinger hervorgeht) der Ausfall der Epithelkörperchen. Bereits nach Exstirpation von drei Epithelkörperchen bei Hunden kann im Stadium einer latenten Tetanie (die ohne Krämpfe einhergeht und sich nur durch eine typische Veränderung der elektrischen Erregbarkeit verrät) anscheinend eine enorme Herabsetzung der Assimilationsgrenze für Traubenzucker zur Beobachtung gelangen. Wurde die Exstirpation mehrerer Epithelkörperchen mit derjenigen des Pankreas kombiniert, so wurde eine gewaltige Steigerung des Hungereiweißumsatzes und gleichzeitig eine Erhöhung des Quotienten D/N auf den Wert 3,5 beobachtet (wie er etwa bei maximaler Phlorizinglucosurie in Erscheinung tritt). Man ist daher allem Anscheine nach berechtigt, die Schilddrüse und die Epithelkörperchen in bezug auf den Kohlenhydratstoffwechsel als Antagonisten anzusehen."

Mit Rücksicht auf den Umstand, daß nach der Meinung vieler Autoren Hyperthyreoidismus die Assimilationsgrenze für Zucker herabsetzt und man gegenwärtig wohl berechtigt ist, den Morbus Basedowii als eine Form von Hyperthyreoidismus anzusehen, erscheint es von besonderem Interesse, daß Ludwig und Kraus, ferner Chvostek sowie viele andere Beobachter den Morbus Basedowii vielfach mit alimentärer Glucosurie vergesellschaftet gefunden haben, und zwar scheinen (nach Eppingers Beobachtungen aus C. v. Noordens Klinik) namentlich jene Basedowfälle zu alimentärer Glucosurie zu disponieren, bei denen Symptome erhöhter Sympathicuserregung im Vorgergrunde stehen.

Flesch[1]) fand in 60% der untersuchten Fälle von Morbus Basedowii alimentäre Glucosurie und vermochte auch bei Zufuhr von Schilddrüsensubstanz per os oder mittels Transplantation eine alimentäre Hyperglykämie zu erzeugen. F. Schultze[2]) fand, daß alimentäre Glucosurie bei Morbus Basedowii keine sehr häufige Erscheinung ist; dagegen wurde bei 80% der untersuchten Fälle nach vorausgegangener Darreichung von 100 g Traubenzucker eine Glucosurie durch sehr geringe, an sich nicht glucosurisch wirksame Adrenalingaben ausgelöst.

Nach Eppinger, Falta und Rudinger, die die „Drüsen mit innerer Sekretion" in solche mit akzeleratorischer und solche mit retardiver Stoffwechselfunktion sondern, wäre die Thyreoidea der ersteren, das System der Epithelkörperchen der letzteren Gruppe anzureihen. Nachstehendes, von Aschner[3]) ausgestaltetes Schema genannter Autoren gibt die hypothetische Vorstellung über die gegenseitige

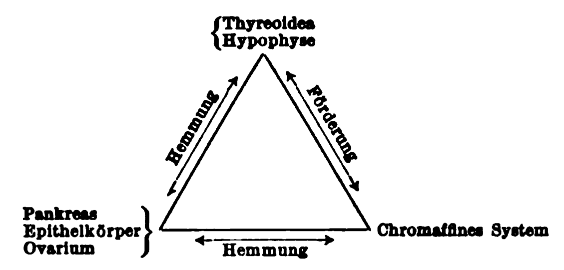
---

[1]) Flesch, Beiträge z. klin. Chir. 82, 236, 1912.

[2]) Schultze, Beiträge z. klin. Chir. 82, 207, 1912.

[3]) Aschner, Arch. f. d. ges. Physiol. 146, 114, 1912.

Förderung und Hemmung der „Drüsen mit innerer Sekretion", die angeblich den Kohlenhydratstoffwechsel beherrschen sollen, wieder:



Höckendorf[1]), der kürzlich die Beziehungen zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und innerer Sekretion in einer Monographie behandelt hat, behauptet[2]), „daß wir nach Ausfall der Epithelkörperchen nirgends Erscheinungen finden, die auf eine ungestörte Zuckerbildung aus Eiweiß und Fett hindeuten. Man müsse vielmehr annehmen, daß hierbei die Zuckersynthese mangelhaft sei oder ganz ausfällt". Ferner an anderer Stelle[3]): „Die Epithelkörperchen sind das dritte und vielleicht letzte Glied in der Reihe von Drüsen, die die Zuckerbildung aus Eiweiß und Fett zustande bringen. Fallen sie fort, so leidet die Synthesenzuckerbildung erheblich, oder sie kann überhaupt nicht stattfinden, und es müssen Erscheinungen der Atrophie und Kachexie eintreten."

Während also die Mehrzahl der Autoren (s. o.) eine hochgradige Herabsetzung der Assimilationsgrenze nach Ausfall der Epithelkörperchen, also die Tendenz zu erhöhter Zuckermobilisierung betont, wird hier umgekehrt in dogmatischer Weise erklärt, daß die synthetische Neubildung von Zucker dabei hochgradigen Schaden leide.

Eine kritische Betrachtung dieser und ähnlicher Meinungen läßt die durchaus hypothetische Natur derselben sowie die Ungeklärtheit des ganzen Problems ohne weiteres erkennen.

Ich bin daher gerne einer Aufforderung des Herrn Prof. v. Fürth nachgekommen, den Einfluß der Thyreoparathyreoidektomie auf den Kohlenhydratstoffwechsel durch neuerliche, streng objektive Untersuchungen genauer festzustellen.

Diese Untersuchungen wurden durch den Umstand ermöglicht, daß Herr Prof. Alois Kreidl, der über seine Erfahrung betreffend den Einfluß zweizeitiger Thyreoparathyreoidektomie auf Katzen an anderer Stelle in dieser Zeitschrift berichtet, mir einige der von ihm operierten Tiere

---

[1]) Höckendorf, Der Kohlenhydratstoffwechsel und die innere Sekretion. Verlag von Hirschwald. Berlin 1912.

[2]) l. c. S. 113.

[3]) l. c. S. 118.

in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hat, wofür ich ihm auch hier meinen verbindlichsten Dank abstatten möchte.

I. Versuche über die Assimilationsgrenze für Galaktose.

Wir stellten uns zunächst die Aufgabe, zu ermitteln, ob durch die halbseitige bzw. doppelseitige Thyreoparathyreoidektomie die Assimilationsgrenze für Galaktose bei Katzen in auffälliger Weise verschoben wird. Wir haben die alimentäre Galaktosurie der Beobachtung alimentärer Glucosurie vorgezogen. Zweifellos vermag der Organismus eine Umwandlung von Galaktose in Traubenzucker zu vollführen. Es geht dies aus dem Umstande hervor, daß die Galaktose ein Glykogenbildner ist und andererseits beim schweren Diabetes quantitativ in Harnzucker übergeht. Immerhin wird die Galaktose im Organismus aber zweifellos schwerer verwertet als Dextrose und Lävulose, und dieselbe kann insbesondere beim Fleischfresser bereits nach geringen Gaben in den Harn übergehen.

Die Galaktose wurde den Katzen teils per os, teils subcutan verabreicht. Im ersten Falle in Milch, im letzten Falle in steriler wässeriger Lösung.

Die Galaktosebestimmung im Harne wurde in der Regel nach zwei Methoden ausgeführt, einerseits nach der Reduktionsmethode von Pavy-Kumagawa, andererseits auf polarimetrischem Wege mit Hilfe eines Halbschattenapparates von Schmidt & Hänsch (Berlin).

Versuch 1.

Katze Nr. 1. Körpergewicht 2500 g.

1. Versuche im normalen Zustande.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden		Nahrung	Bemerkungen
		Volumen ccm	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g		
21. V.	—	60	0	Reichl. Milch- und Fleischfütterung	Kein Eiweiß im Harn
22.	3,0	95	0,5277	do.	do.
23.	—	60	0	do.	do.
28.	5,0	40	1,3676	do.	do.
29.	—	50	0	do.	do.
30.	10,0	60	2,2641	do.	do.
31.	—	26	0	do.	do.

2. Versuche nach der einseitigen Thyreoparathyreoidektomie am 4. VI. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Harn in 24 Stunden: Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
13. VI.	—	40	—	0	0	Milch + Fleisch	Die Operationswunde schon geheilt. Kein Eiweiß im Harn.
14.	3,0	72	1042	0,3428	0,2755	do.	Kein Eiweiß im Harn.
15.	—	75	1043	0	0	do.	do.
17.	5,0	55	1045	0,7364	0,5340	do.	do.
18.	—	40	—	0	0	do.	do.
19.	10,0	95	1050	1,6814	1,3604	do.	do.
20.	—	30	—	0	0	do.	do.
21.	10,0	63	1053	2,1000	—	do.	do.
22.	—	37	—	0	0	do.	do.
23.	—	28	—	0	0	do.	do.
24.	10,0	72	1047	2,3225	2,2933	do.	do.
25.	—	28	—	0	0	do.	do.

3. Versuche nach der beiderseitigen Thyreoparathyreoidektomie am 27. VI. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Harn in 24 Stunden: Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
29. VI.	—	—	—	—	—	—	Angestrengte beschleunigte Atmung, später Krampfanfall.
4. VII.	—	—	—	—	—	—	Atmung frequent, 54 in der Minute. Klonische Zuckungen, bald am Kopf, bald am Rumpf und den Extremitäten, treten ab und zu ein.
5.	—	—	—	—	—	—	Krampfanfälle häufen sich. Das Tier ist sehr niedergeschlagen.
6.	3,0	41	—	0,4392	0,2580	Milch + Fleisch	
7.	—	30	—	0	0	Milch (künstlich genährt)	Atmung ruhig, 30 in der Minute. Klonische Zuckungen am Kopf und an den Extremitäten unverändert.
8.	—	—	—	—	—	—	Nachmittags tot aufgefunden.

Bei der Sektion wurde die vollständige Exstirpation von Schilddrüse und Epithelkörperchen konstatiert und es wurden keine akzessorischen Drüsen gefunden.

Versuch 2.

Katze Nr. 2. Körpergewicht 3300 g.

1. Versuche im normalen Zustande.

Datum 1912	Menge von Galaktose (subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
30. V.	—	83	—	0	0	Milch + Fleisch	Kein Eiweiß im Harn.
31.	5,0	107	1032	0	0	do.	do.
2. VI.	—	52	1059	0	0	do.	do.
4.	10,0	—	—	—	—	do.	Keine Harnentleerung.
5.	—	95	1050	0,7039	0,4850	do.	Kein Eiweiß im Harn.
6.	—	57	1065	0	0	do.	do.
7.	15,0	103	1055	6,4375	6,1234	do.	do.
8.	—	27	—	0	0	do.	do.
11.	20,0	94	1054	4,7066 } 5,3995	4,4000 } 4,8900	do.	do.
12.	—	22	—	0,6929 }	0,4900 }	do.	do.
13.	—	55	1065	0	0	do.	do.

2. Versuche nach der einseitigen Exstirpation am 18. VI. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
28. VI.	10,0	70	1019	0,5691 } 2,7927	0,4839 } 2,7797	Milch + Fleisch	Kein Eiweiß im Harn.
29.	—	74	1053	1,9473 }	2,0300 }	do.	do.
30.	—	53	1053	0,2763 }	0,2658 }	do.	do.
1. VII.	—	52	1054	0	0	do.	do.
2.	15,0	28	—	2,3333 } 3,7962	2,3222 } 3,5998	do.	do.
3.	—	79	1058	1,4629 }	1,2776 }	do.	do.
4.	—	64	1051	0	0	do.	do.
6.	20,0	60	1067	2,4000 } 2,7708	2,3770 } 2,7773	do.	do.
7.	—	89	1047	0,3708 }	0,4003 }	do.	do.
8.	—	25	—	0	0	do.	do.

3. Versuche nach der beiderseitigen Exstirpation am 11. VII. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
16. VII.	10,0	81	1070	1,8837 } 2,4703	1,5600 } 2,1400	Milch + Fleisch	Kein Eiweiß im Harn.
18.	—	88	1045	0,5866 }	0,5800 }	do.	do.
19.	—	25	—	0	0	do.	do.
20.	15,0	114	1046	4,0714 } 6,5214	3,7438 } 5,7159	do.	Klonische Krampfanfälle. Atmung 54. Operationswunde ist schon geheilt.
21.	—	—	—	— }	— }	do.	Keine Harnentleerung.
22.	—	49	1048	2,4500 }	1,9721 }	do.	
23.	—	—	—	—	—	—	Morgens tot aufgefunden.

Bei der Sektion wurden totale Exstirpationen von beiden Drüsen und das Fehlen von akzessorischen Drüsen konstatiert.

Versuch 3.

Katze Nr. 3. Körpergewicht 3800 g.

1. Versuche im normalen Zustande.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
4. VI.	—	85	1058	0	0	Milch + Fleisch	Kein Eiweiß im Harn.
5.	5,0	51	1063	0,4811	0,3900	do.	do.
6.	—	52	1061	0	0	do.	do.
9.	10,0	55	1060	1,2601	0,8963	do.	do.
10.	—	45	1061	0	0	do.	do.
11.	15,0	47	1070	2,2412	1,7624	do.	do.
12.	—	24	—	0	0	do.	do.

2. Versuche nach der einseitigen Operation am 18. VI. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
27. VI.	5,0	68	1057	0,6331	0,5980	Milch + Fleisch	Die Operationswunde ist schon geheilt.
30.	10,0	78	1059	1,7333	1,3246	do.	Kein Eiweiß im Harn.
1. VII.	—	71	1056	0	0	do.	do.
4.	15,0	71	1061	1,7457	1,7100	do.	do.
5.	—	40	1057	0	0	do.	do.

3. Versuche nach der beiderseitigen Operation am 6. VII. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (per os) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
10. VII.	5,0	123	1057	0,8785	0,6074	Milch + Fleisch	Die Operationswunde ist im Begriff zu heilen.
13.	10,0	109	1057	1,2528	1,0765	do.	Kein Eiweiß im Harn.
14.	—	50	1056	0	0	do.	do.
15.	15,0	104	1065	2,0526 } 2,4588	2,0493 } 2,4493	do.	do.
16.	—	65	1057	0,4062	0,4000	do.	do.
1. X.	—	—	—	—	—	—	Seit einigen Wochen Appetit schlecht und deutliche Abmagerung.
8.	—	—	—	—	—	—	Tier stark niedergeschlagen.
9.	—	—	—	—	—	—	Früh tot aufgefunden. Körpergewicht auf 2850 g abgesunken.

Bei der Sektion wurde totale Exstirpation der beiden Drüsensysteme und das Fehlen akzessorischer Drüsen sichergestellt. Weiterhin wurden allgemeine Anämie sowie Verfettung von Leber- und Nierenzellen durch die Sudanfärbung konstatiert.

Versuch 4.

Katze Nr. 4. Körpergewicht 3000 g.

1. Versuche im normalen Zustande.

Datum 1912	Menge von Galaktose (subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
19. VI.	5,0	69	1050	0,8801	0,3066	Milch + Fleisch	Eiweiß im Harn: Spur.
20.	—	66	1043	0	0	do.	do.
21.	10,0	88	1049	3,3846	3,3244	do.	do.
22.	—	26	—	0	0	do.	do.
25.	10,0	69	1058	3,2413	2,8837	do.	do.
26.	—	55	1053	0	0	do.	do.
9. VII.	15,0	68	1050	1,9615 } 2,3562	1,9812 } 2,2219	do.	do.
10.	—	75	1054	0,3947	0,2407	do.	do.
11.	—	35	—	0	0	do.	do.

2. Versuche nach der **einseitigen** Exstirpation am 11. VII. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose (subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
22. VII.	5,0	57	1061	1,1894	1,0844	Milch + Fleisch	Eiweiß im Harn: Spur.
23.	—	23	—	0	0	do.	do.
24.	10,0	70	1066	2,2234 } 2,5789	2,2123 } 2,4552	do.	do.
25.	—	48	1062	0,3555 }	0,2429 }	do.	do.
26.	—	22	—	0	0	do.	do.
27.	15,0	86	1062	4,4482	4,8945	do.	do.
28.	—	20	—	0	0	do.	do.

3. Versuche nach der **beiderseitigen** Exstirpation am 11. X. 1912.

Datum 1912	Menge von Galaktose subcutan) g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gewicht	Galaktose (nach Pavy-Kumagawa) g	Galaktose polarimetrisch g	Nahrung	Bemerkungen
17. X.	5,0	79	1052	0,6000	0,3673	Milch + Fleisch	Die Operationswunde ist geheilt.
18.	10,0	53	1057	1,3125 } 1,7065	1,0028 } 1,2728	do.	Eiweiß im Harn: Spur.
19.	—	95	1050	0,3940 }	0,2700 }	do.	do.
23.	15,0[1]	16	—	1,6000	1,4000	do.	Das Tier sieht sehr matt aus. Schlechter Appetit. Respiration 52. Fortwährendes Stöhnen, Zittern der Extremitäten. Gegen Abend tot aufgefunden.

Auch in diesem Falle wurde bei der Autopsie die vollständige Entnahme der beiden Drüsenarten und das Fehlen akzessorischer Drüsen konstatiert.

Ich stelle die Versuchsresultate in einer Übersichtstabelle zusammen, wobei die jeder Galaktosegabe entsprechende mittlere Zuckerausscheidung angeführt wird.

[1]) Innerhalb 3 Stunden nach der Injektion entleerter Harn. Einige Stunden später tot aufgefunden; bei der Sektion fand sich kein Harn in der Blase.

Übersichtstabelle.

Versuch:	1			2			3			4		
Verabreichungsmodus:	per os			subcutan			per os			subcutan		
	Normales Tier	Operation		Normales Tier	Operation		Normales Tier	Operation		Normales Tier	Operation	
		halbseitig	doppelseitig		halbseitig	doppelseitig		halbseitig	doppelseitig		halbseitig	doppelseitig
Galaktose 3 g	0,53	0,31	0,35	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ 5 g	1,37	0,64	—	0,00	—	—	0,43	0,61	0,74	0,59	1,13	0,48
„ 10 g	2,26	1,95	—	0,59	2,78	2,30	1,08	1,53	1,16	3,21	2,51	1,49
„ 15 g	—	—	—	6,28	3,69	6,11	2,00	1,73	2,45	2,29	4,67	1,50
„ 20 g	—	—	—	5,14	2,77	—	—	—	—	—	—	—

Ziehen wir schließlich, um die in diesem Falle immerhin erheblichen individuellen Differenzen und Schwankungen nach Möglichkeit auszuschalten, die bei vier Tieren ermittelten Versuchsdaten in eine Durchschnittszahl zusammen, so ergibt sich folgendes Schlußresultat:

Galaktosezufuhr g	Normales Tier	Thyreoparathyreoidektomie	
		halbseitig	doppelseitig
5	0,60	0,79	0,61
10	1,78	2,19	1,65
15	3,52	3,36	3,35

Wir gelangen demnach zum Schlußergebnisse, daß weder die halbseitige noch die doppelseitige Thyreoparathyreoidektomie die Assimilationsgrenze für Galaktose in auffälliger und unzweideutiger Weise zu verschieben vermag.

II. Versuche über den Einfluß der Thyreoparathyreoidektomie auf den Zucker-Stickstoffquotienten bei der Phlorizinvergiftung.

Bekanntlich bietet die Beobachtung der Relation zwischen ausgeschiedener Zucker- und Stickstoffmenge die Möglichkeit, den Zusammenhang zwischen Zuckerneubildung und Eiweißzerfall, wie er bei den verschiedenen Diabetesformen in Erscheinung tritt, systematisch zu verfolgen. Insbesondere beim Phlorizindiabetes ist durch die Untersuchungen von Minkowski,

Versuch 5.

a) Versuche an der normalen Katze Nr. 5.

Datum	Körpergewicht	Phlorizin	Harn in 24 Stunden				D:N	Fütterung	Bemerkungen
			Volumen	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa)	Stickstoff			
1912	g	g	ccm		g	g			
2. XI.	3,410	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
3.	—	—	130	1055	0	7,2188	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
4.	—	—	—	—	—	—	—	"	Keine Harnentleerung.
5.	—	—	88	1041	0	3,3098	—	"	Kein Eiweiß im Harn.
6.	—	1,0 2 mal tägl.	83	1066	7,5454	2,5164	2,9984	Fleisch 50 g	do.
7.	—	do.	132	1081	13,8947	5,2521	2,6456	do.	do.
8.	—	do.	184	1032	6,4561	2,7015	2,3896	do.	do.
9.	—	—	92	1031	1,0774	2,5314	0,4254	do.	do.
10.	3,200	—	67	1042	0	—	—	do.	do.

b) Versuche nach der einseitigen Thyreoparathyreoidektomie am 14. XI. 1912.

Datum	Körpergewicht	Phlorizin	Harn in 24 Stunden				D:N	Fütterung	Bemerkungen
			Volumen	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa)	Stickstoff			
1912	g	g	ccm		g	g			
23. XI.	2,800	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
24.	—	—	—	—	—	—	—	Inanition	Keine Harnentleerung.
25.	—	—	45	1042	0	1,5610	—	"	Kein Eiweiß im Harn.
26.	—	1,0 2 mal tägl.	55	1052	3,0555	1,2483	2,4477	Fleisch 50 g	do.
27.	—	do.	192	1062	13,7142	4,8902	2,8043	do.	do.
28.	—	do.	38	1062	2,8148	0,9848	2,8582	do.	do.
29.	2,550	—	—	—	—	—	—	do.	Harn ungereinigt.
30.	—	—	118	1045	0	—	—	do.	Kein Eiweiß im Harn.

Lusk und vielen anderen Autoren die relative Konstanz des Zucker-Stickstoffquotienten vielfach sichergestellt worden[1]). Minkowski fand bei pankreaslosen Hunden eine Relation D/N = 2,8, Lusk bei hungernden phlorizindiabetischen Hunden D/N = 3,75, während beim Kaninchen, der Ziege und nach Arteaga[2]) auch

[1]) Vgl. Lusk, Phlorizinglucosurie. Ergebn. d. Physiol. **12**, 315, 1912.
[2]) Arteaga, Amer. Journ. of Physiol. **6**, 173, 1902.

c) Versuche nach der **beiderseitigen** Thyreoparathyreoidektomie am 11. XII. 1912.

Datum 1912	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
13. XII.	2,870	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
14.	—	—	—	—	—	—	—	Inanition	Keine Harnentleerung.
15.	—	—	95	1050	0	4,0407	—	"	Kein Eiweiß im Harn.
16.	—	1,0 2 mal tägl.	57	1073	5,1363	1,8103	2,8372	Fleisch 50 g	do.
17.	—	do.	80	1075	8,6486	2,7257	3,1730	do.	do.
18.	—	do.	93	1071	8,4545	2,9888	2,8286	do.	do.
19.	—	—	59	1059	3,3714	1,9689	1,7123	do.	do.
20.	2,600	—	—	—	—	—	—	—	

d) Versuche 24 Tage nach der totalen Exstirpation.

Datum 1913	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
4. I.	3,300	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
5.	—	—	73	1029	0	1,3814	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
6.	—	—	70	1024	0	1,1886	—	"	do.
7.	—	1,0 2 mal tägl.	114	1039	5,4285	1,2936	4,1960	Fleisch 50 g	do.
8.	—	do.	74	1050	5,9200	1,0491	5,6200	do.	do.
9.	—	do.	85	1071	8,4500	2,0480	4,1258	do.	do.
10.	3,100	—	—	—	—	—	—	—	

bei Katzen D/N = 2,8 ist. Stets erwies sich der Zucker-Stickstoffquotient vom Umfange des Eiweißzerfalls im Organismus, also auch von der Größe der Eiweißzufuhr in hohem Grade unabhängig.

Ich ging nun daran, festzustellen, ob die halbseitige bzw. doppelseitige Thyreoparathyreoidektomie bei phlorizindiabetischen Katzen eine auffällige Verschiebung des Stickstoff-Quotienten zur Folge habe. Liegt es doch auf der Hand, daß, wenn z. B. die von Höckendorf (s. o.) geäußerte Meinung, ein seiner Epithel-

e) Versuche 37 Tage nach der totalen Exstirpation.

Datum 1913	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
17. I.	3,400	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
18.	—	—	61	1015	0	0,8785	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
19.	—	—	53	1027	0	1,1598	—	"	do.
20.	—	—	—	—	—	—	—	"	Keine Harnentleerung.
21.	—	—	78	1034	0	1,3681	—	"	Kein Eiweiß im Harn.
22.	—	1,0 2 mal tägl.	80	1055	6,1538	1,0916	5,6375	Fleisch 50 g	do.
23.	—	do.	102	1063	8,5000	2,1121	4,0244	do.	do.
24.	—	do.	84	1055	5,2187	1,7079	3,0554	do.	do.
25.	2,900	—	—	—	—	—	—	—	

Versuch 6.

a) Versuche an der normalen Katze Nr. 6.

Datum 1912	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
9. XI.	4,100	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
10.	—	—	67	1040	0	2,1232	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
11.	—	—	56	1045	0	2,1507	—	"	do.
12.	—	1,0 2 mal tägl.	139	1058	11,1200	3,0106	3,6935	Fleisch 50 g	do.
13.	—	do.	286	1050	14,6660	6,6754	2,1976	do.	do.
14.	—	do.	258	1049	14,5352	5,8990	2,4647	do.	do.
15.	—	—	203	1030	6,7660	4,6642	1,4506	do.	do.
16.	3,720	—	128	1046	2,2654	4,6481	0,4874	do.	do.
17.	—	—	103	1044	0	—	—	—	do.

körper beraubtes Tier sei nicht mehr imstande, Eiweiß zu Zucker umzusetzen, richtig wäre, sich dies beim Phlorizindiabetes durch ein hochgradiges Absinken von D/N in auffälligster Weise verraten müßte.

Was unsere Versuchsanordnung betrifft, wurde das Phlorizin (Kahlbaum) unseren Versuchstieren, also Katzen, in 1 $^0/_0$iger sterilisierter Sodalösung in Dosen zu je 1 g subcutan einverleibt.

b) Versuche nach der einseitigen Thyreoparathyreoidektomie am 26. XI. 1912.

Datum 1912	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
6. XII.	3,300	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
7.	—	—	98	1015	0	1,2266	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
8.	—	—	67	1018	0	0,8955	—	„	do.
9.	—	1,0 2 mal tägl.	178	1040	9,1282	2,7631	3,3036	Fleisch 50 g	do.
10.	—	do.	233	1045	13,1267	4,5636	2,8763	do.	do.
11.	—	do.	145	1056	9,0625	2,5286	2,5682	do.	do.
12.	3,100	—	—	—	—	—	—	—	Harn ungereinigt.

c) Versuche nach der beiderseitigen Thyreoparathyreoidektomie am 8. I. 1913.

Datum 1913	Körpergewicht g	Phlorizin g	Harn in 24 Stunden: Volumen ccm	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Stickstoff g	D:N	Fütterung	Bemerkungen
11. I.	3,550	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	Das Tier ist im tetanoiden Zustand.
12.	—	—	189	1018	0	2,6320	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
13.	—	—	—	—	—	—	—	„	Keine Harnentleerung.
14.	—	—	84	1047	0	3,4905	—	„	Kein Eiweiß im Harn.
15.	—	1,0 2 mal tägl.	106	1063	8,8333	2,3612	3,7407	Fleisch 50 g	do.
16.	—	do.	106	1070	9,4222	3,3087	2,8476	do.	do.
17.	—	do.	208	1048	10,6660	4,1321	2,5811	do.	do.
18.	3,180	—	—	—	—	—	—	—	

Wir gingen dabei ähnlich wie Arteaga[1]) vor, mit der Abweichung jedoch, daß wir die Phlorizingaben nicht 3 mal, sondern 2 mal täglich wiederholten. Auch zogen wir es vor, anstatt die Tiere hungern zu lassen, denselben während der Injektionstage täglich eine kleine Menge Fleisch (50 g) zur Verfügung zu stellen. Der Nachteil einer durch etwaige Unregelmäßigkeiten

[1]) l. c.

d) Versuche 17 Tage nach der totalen Exstirpation.

Datum	Körpergewicht	Phlorizin	Harn in 24 Stunden				D:N	Fütterung	Bemerkungen
			Volumen	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa)	Stickstoff			
1913	g	g	ccm		g	g			
25. I.	3,670	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
26.	—	—	55	1030	0	1,2267	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
27.	—	—	51	1023	0	1,0131	—	"	do.
28.	—	1,0 2 mal tägl.	103	1043	6,2424	1,4805	4,2161	Fleisch 50 g	do.
29.	—	do.	233	1030	10,1304	2,0304	4,9890	do.	do.
30.	—	do.	108	1051	7,6785	1,8555	4,1382	do.	do.
31.	3,270	—	—	—	—	—	—	—	

e) Versuche 29 Tage nach der totalen Exstirpation.

Datum	Körpergewicht	Phlorizin	Harn in 24 Stunden				D:N	Fütterung	Bemerkungen
			Volumen	Spez. Gew.	Zucker (nach Pavy-Kumagawa)	Stickstoff			
1913	g	g	ccm		g	g			
8. II.	3,870	—	—	—	—	—	—	Milch + Fleisch	
9.	—	—	76	1026	0	1,4033	—	Inanition	Kein Eiweiß im Harn.
10.	—	—	91	1032	0	2,2413	—	"	do.
11.	—	1,0 2 mal tägl.	135	1037	7,5000	1,3088	5,7303	Fleisch 50 g	do.
12.	—	do.	78	1055	6,5000	1,4184	4,5825	do.	do.
13.	—	do.	112	1055	8,2963	2,2187	3,7391	do.	do.
14.	3,420	—	—	—	—	—	—	—	

der Nahrungsaufnahme bewirkten Unregelmäßigkeit in der Stickstoffausscheidung wird dadurch aufgewogen, daß die Tiere, welche die Einwirkung des Schilddrüsenausfalles und dazu noch die Vergiftung mit Phlorizin aushalten müssen, nicht noch überdies durch Hunger geschwächt und geschädigt werden. Daß die Relation D/N, auf die es uns ankam, selbst nach Zufuhr großer Eiweißmengen bei Phlorizintieren nicht wesentlich verschoben erscheint, ist durch viele Beobachtungen anderer Autoren sichergestellt worden.

Ich stelle die Resultate der mitgeteilten Versuche, soweit dieselben die Stickstoff- und Zuckerausscheidung, sowie den

Zucker-Stickstoffquotienten betreffen, in einer Übersichtstabelle zusammen, wobei die Summen der Stickstoff- bzw. Zuckermenge, die an den drei aufeinander folgenden Phlorizintagen eliminiert worden sind, kenntlich gemacht werden.

Übersichtstabelle.

Versuch 5.

	D		N		D/N (Durchschnittszahl)	
Im normalen Zustande	7,5454 13,8947 6,4561	27,8962	2,5164 5,2521 2,7015	10,4700	2,9984 2,6456 2,3896	2,6778
Nach halbseitiger Operation	3,0555 13,7142 2,8148	19,5845	1,2483 4,8902 0,9848	7,1233	2,4477 2,8043 2,8582	2,7034
Nach doppelseitiger Operation	5,1363 8,6486 8,4545	22,2394	1,8103 2,7257 2,9888	7,5248	2,8372 3,1730 2,8286	2,9462
14 Tage nach der totalen Operation	5,4285 5,9200 8,4500	19,7985	1,2936 1,0491 2,0480	4,3907	4,1960 5,6200 4,1258	4,6472
37 Tage nach der totalen Operation	6,1538 8,5000 5,2187	19,8725	1,0916 2,1121 1,7079	4,9116	5,6375 4,0244 3,0554	4,2391

Versuch 6.

	D		N		D/N (Durchschnittszahl)	
Im normalen Zustande	11,1200 14,6660 14,5352	40,3212	3,0106 6,6754 5,8990	15,5850	3,6935 2,1976 2,4647	2,7852
Nach halbseitiger Operation	9,1282 13,1267 9,0625	31,3174	2,7631 4,5636 3,5286	10,8553	3,3036 2,3863 2,5682	2,9160
Nach doppelseitiger Operation	8,8333 9,4222 10,6660	28,9215	2,3612 3,3087 4,1321	9,8020	3,7407 2,8476 2,5811	3,0564
17 Tage nach der totalen Exstirpation	6,2424 10,1304 7,6785	24,0513	1,4805 2,0304 1,8555	5,3664	4,2161 4,9890 4,1382	4,4477
29 Tage nach der totalen Exstirpation	7,5000 6,5000 8,2963	22,2963	1,3088 1,4184 2,2187	4,9459	5,7303 4,5825 3,7391	4,6839

Das Resultat dieser Versuche ist ein höchst auffälliges:

Wir sehen, daß weder die halbseitige noch aber doppelseitige Operation einen zweifellosen unmittelbaren Einfluß auf die Zucker- bzw. Stickstoffausscheidung oder auf den Zucker-Stickstoffquotienten ausgeübt hat. Die Konstanz dieses letzteren ist vielmehr bei beiden Versuchen eine geradezu überraschende.

Dagegen stellt sich einige Wochen nach totaler Exstirpation der Schilddrüse und Epithelkörperchen eine höchst auffällige Stoffwechseländerung ein, insofern dem Absinken der Stickstoffausscheidung ein Absinken der Zuckerausscheidung keineswegs parallel geht. Diese letztere bleibt vielmehr nahezu konstant (Versuch 5) bzw. sinkt nur relativ wenig ab, derart, daß der Zucker-Stickstoffquotient einen sehr erheblichen Anstieg erfährt.

Die Diskussion dieser Resultate wird später erfolgen.

III. Versuche über Adrenalinglucosurie bei thyreoparathyreoidektomierten Tieren.

Wir haben schließlich eine Reihe von Versuchen ausgeführt, um festzustellen, ob der Ablauf einer Adrenalinglucosurie durch eine vorausgegangene totale Thyreoparathyreoidektomie in wesentlicher Weise modifiziert wird.

a) Versuche an der normalen Katze (A).

Datum 1913	Körpergewicht g	Menge des Adrenalins mg	Menge des Adrenalins pro kg Körpergewicht mg	Harn in 24 Stunden Volumen ccm	Harn in 24 Stunden Spez. Gewicht	Harn in 24 Stunden Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Bemerkungen
18. II.	3,150	—	—	63	1051	0	Kein Eiweiß im Harn.
19.	—	—	—	96	1040	0	do.
20.	—	0,5	(0,158)	189	1017	1,3125	do.
21.	—	—	—	60	1050	0	do.
22.	—	—	—	92	1036	0	do.
23.	—	0,5	(0,158)	76	1037	0	do.
24.	—	—	—	105	1028	0	do.
25.	—	1,0	(0,317)	121	1036	3,2266	do.
26.	—	—	—	96	1036	0	do.
27.	—	2,0	(0,634)	243	1023	4,7647	do.
28.	—	—	—	70	1040	0	do.
1. III.	—	3,0	(0,95)	131	1035	5,4583	do.
2.	—	—	—	185	1023	0	do.
3.	3,000	—	—	—	—	—	do.

Während der Versuchsdauer reichlich Fleisch gegeben. Das Tier frißt gut.

b) Versuche an der normalen Katze (B).

Datum 1913	Körpergewicht g	Menge des Adrenalins mg	Menge des Adrenalins pro kg Körpergewicht mg	Harn in 24 Stunden Volumen ccm	Harn in 24 Stunden Spez. Gewicht	Harn in 24 Stunden Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Bemerkungen
11. III.	4,200	—	—	47	1043	0	Kein Eiweiß im Harn.
12.	—	2,5	(0,595)	99	1045	3,2833	do.
13.	—	4,0	(0,952)	207	1035	2,3615 } 5,2365	do.
14.	—	—	—	58	1050	2,8750 }	do.
15.	3,940	—	—	125	1016	0	do.

Hier auch reichlich Fleisch gegeben. Das Tier frißt wenig.

c) Versuche an der Katze Nr. 5 nach doppelseitiger Thyreoparathyreoidektomie.

Datum 1913	Körpergewicht g	Menge des Adrenalins mg	Menge des Adrenalins pro kg Körpergewicht mg	Harn in 24 Stunden Volumen ccm	Harn in 24 Stunden Spez. Gewicht	Harn in 24 Stunden Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Bemerkungen
21. II.	3,450	—	—	85	—	0	Kein Eiweiß im Harn.
22.	—	0,5	(0,144)	52	1036	0	do.
23.	—	—	—	—	—	—	Keine Harnentleerung.
24.	—	—	—	93	1037	0	Kein Eiweiß im Harn.
25.	—	1,0	(0,288)	67	1041	1,1875 } 1,9565	do.
26.	—	—	—	—	—	— }	Keine Harnentleerung.
27.	—	—	—	91	1050	0,7690 }	Kein Eiweiß im Harn.
28.	—	2,0	(0,579)	87	1032	1,1447	do.
1. III.	—	—	—	—	—	—	Keine Harnentleerung.
2.	—	—	—	84	1048	0	Kein Eiweiß im Harn.
7.	—	3,0	(0,869)	64	1050	0,4379 } 1,8754	do.
8.	—	—	—	—	—	— }	Keine Harnentleerung.
9.	—	—	—	115	1043	1,4375 }	Kein Eiweiß im Harn.
10.	3,530	—	—	—	—	—	

Ich gebrauchte zu diesem Zwecke die Katzen, die im Versuch 5 und 6 zur Verwendung gekommen waren. Kontrollversuche führte ich an normalen Katzen aus.

Ich habe die intramuskuläre Beibringung des Adrenalins der subcutanen oder intraperitonealen Applikationsweise vorgezogen, da bei der subcutanen Injektion größerer Adrenalinmengen die Bildung von Nekrosen zu gewärtigen ist, die daraus erfolgende Erkrankung aber zu Stoffwechselalterationen Anlaß geben kann. Bei einer intraperitonealen Applikationsweise besteht wiederum die Gefahr einer peritonealen Reizung, die

d) Versuche an der Katze Nr. 6 nach doppelseitiger Thyreoparathyreoidektomie.

Datum 1913	Körpergewicht g	Menge des Adrenalins mg	pro kg Körpergewicht mg	Harn in 24 Stunden Volumen ccm	Spez. Gewicht	Zucker (nach Pavy-Kumagawa) g	Bemerkungen
3. III.	3,750	—	—	120	1010	0	Kein Eiweiß im Harn.
4.	—	—	—	63	1030	0	do.
5.	—	1,5	(0,4)	155	1018	0,5344	do.
6.	—	—	—	44	1043	0	do.
7.	—	2,5	(0,66)	212	1015	1,3589 } 1,8864	do.
8.	—	—	—	51	1040	0,5275 }	do.
9.	—	—	—	91	1035	0	do.
10.	—	3,5	(0,93)	162	1023	1,0945	do.
11.	—	—	—	44	1038	0	do.
12.	3,800	—	—	—	—	—	do.

Es wurde den beiden Tieren auch reichlich Fleisch gegeben. Die Tiere hatten guten Appetit.

nach Untersuchung von Fürth und Schwarz[1]) die Nierentätigkeit und damit auch die Adrenalinglucosurie weitgehend beeinflussen kann.

Aus den mitgeteilten Versuchen geht zweifellos hervor, daß die Zuckerliquidierung unter dem Einflusse des Adrenalins und die sich daraus ergebende Glucosurie bei Tieren, die einige Wochen vorher einer doppelseitigen Thyreoparathyreoidektomie sowie wiederholter Phlorizineinwirkung unterworfen worden waren, wesentlich abgeschwächt erscheint.

IV. Zusammenfassung.

Wenn wir nunmehr die Gesamtheit unserer experimentellen Erfahrungen überblicken, so gelangen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Der Eintritt einer alimentären Galaktosurie wird bei Katzen weder durch halbseitige noch durch doppelseitige Thyreoparathyreoidektomie in auffälliger und eindeutiger Weise beeinflußt.

2. Weder halbseitige noch doppelseitige Thyreoparathyreoidektomie übt bei phlorizindiabetischen Katzen einen unmittelbaren Einfluß auf die Zucker- bzw. Stickstoffausscheidung, noch aber auf den Zucker-Stickstoffquotienten D/N

[1]) O. v. Fürth und Schwarz, diese Zeitschr. 31, 113, 1911.

aus. Es unterliegt daher keinem Zweifel, daß auch ein seiner Schilddrüsen und Epithelkörperchen vollkommen beraubtes Tier in demselben Ausmaße wie ein normales unter der Einwirkung des Phlorizins die Zuckerneubildung auf Kosten zerfallender Proteine zu bewerkstelligen vermag.

3. Dagegen trat einige Wochen nach totaler Ausschaltung der Schilddrüsen und Epithelkörperchen bei Phlorizintieren eine sehr erhebliche Steigerung des Zucker-Stickstoffquotienten zutage, die dadurch bedingt erschien, daß ein Absinken der Stickstoffausscheidung nicht mit einem entsprechenden Absinken der Zuckerliquidation vergesellschaftet war.

4. Der Eintritt der Adrenalinglucosurie erscheint bei Katzen, die einige Wochen vorher ihrer Schilddrüsen und Epithelkörperchen total beraubt und ferner der Phlorizinwirkung unterworfen worden sind, erheblich abgeschwächt.

Meine Versuchsergebnisse bedürfen nach mehreren Richtungen hin einer Vervollständigung. Insbesondere müssen einerseits Versuche an Hungertieren ausgeführt werden, um die durch Unregelmäßigkeiten der Nahrungsaufnahme bedingten Abweichungen in den Stoffwechselvorgängen auszuschalten. Andererseits wird sich die Aufgabe ergeben, meine Versuche an Tieren zu wiederholen, bei denen die Schilddrüsen entfernt, die Epithelkörperchen aber wenigstens zum Teil erhalten, der Eintritt der tetanischen oder tetanoiden Zustände demnach vermieden worden ist. Weiterhin sind aber auch Versuche an Tieren erforderlich, bei denen das Epithelkörperchensystem entfernt, die Schilddrüsen aber nach Möglichkeit geschont worden sind. Schließlich muß festgestellt werden, inwieweit die durch die wiederholte Phlorizinwirkung ausgelösten Störungen des Stoffwechsels als solche sich geltend machen können. Versuche dieser Art sind im hiesigen Physiologischen Institute in Aussicht genommen.

Erst nach Abschluß derselben wird man daran gehen können, meinen Versuchen eine ausreichend fundierte physiologische Deutung zu geben. Auf ein Ausspinnen von Hypothesen jedoch, die vorderhand einer soliden Grundlage entbehren, glaube ich aber an dieser Stelle im Interesse der Objektivität besser verzichten zu sollen.

Untersuchungen über den Einfluß des Chloralhydrats auf experimentelle Hyperglykämieformen.

Von

Aage Th. B. Jacobsen.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut in Lund.)

(Eingegangen am 14. Mai 1913.)

Mit 3 Figuren im Text.

I.

Im Jahre 1901 wies Blum nach, daß Injektion von Nebennierenextrakt an Hunden und Kaninchen konstant Glucosurie hervorrufe.

Bald darauf folgte die Entdeckung, daß das Adrenalin die wirksame Substanz des Nebennierenextrakts sei, sowie daß die durch Adrenalininjektion hervorgerufene Glucosurie von einer Hyperglykämie abhänge. Später wurde die Bedeutung der Nebennieren durch eine Reihe von experimentellen Diabetesformen, durch Zuckerstich, Asphyxie- und die Coffeinghyperlykämie usw., festgestellt, indem die gewöhnliche Wirkung, die Hyperglykämie und die oft damit verbundene Glucosurie, wegfällt, wenn die Versuche an Tieren angestellt werden, deren Nebennieren im voraus entfernt worden sind; dagegen spielt die Nebennierenexstirpation keine Rolle bei anderen Formen, z. B. bei der Aderlaßhyperglykämie.

Bei der erstgenannten Gruppe denkt man sich das Verhältnis so, daß die Hyperglykämie von einer gesteigerten Adrenalinsekretion in den Nebennieren herrührt. Das Adrenalin entleert sich ins Blut und wirkt wie bei dem experimentellen Adrenalindiabetes. Eine wichtige Unterstützung dieser Annahme hat man an dem Umstand, daß die chromaffine Substanz in den Nebennieren bei Zuckerstich schwindet.

Gegen diese Auffassung vom Zuckerstich als einem Adrenalindiabetes spricht jedoch, wie Bang[1]) hervorhebt, verschiedenes. 1. Der Zuckerstich ist ohne Wirkung bei Hungertieren, während die Adrenalininjektion bei ihnen wie bei normalen Tieren Glucosurie erzeugt. 2. Eine vermehrte

[1]) Bang, Der Blutzucker. Wiesbaden 1913.

Adrenalinmenge ist nicht mit Sicherheit nach Zuckerstich im Blute im allgemeinen nachgewiesen worden, was zu erwarten wäre, falls dieser auf einer gesteigerten Adrenalinsekretion beruhen sollte; nur in der Nebennierenvene scheint sie vermehrt. 3. Man findet auch keinen gesteigerten Blutdruck, was man gleichfalls bei gesteigerter Adrenalinsekretion erwarten sollte.

Schließlich hat man hervorgehoben, daß der Zuckerstich im Gegensatz zum Adrenalin während der Narkose ohne Wirkung sei; dieser Unterschied existiert aber nach neueren Untersuchungen nicht, indem es auch während der Narkose gelungen ist, durch Zuckerstich Glucosurie zu erzeugen.

Um zu untersuchen, ob der Zuckerstich sich in anderen Beziehungen vom Adrenalindiabetes unterscheidet, untersuchte ich, von Prof. Bang aufgefordert, die Wirkung des Chloralhydrats auf die Hyperglykämie bei Piqûre und bei Adrenalindiabetes. Eckhardt[1]) und später Neubauer[2]) haben den Einfluß dieses Stoffes auf die durch Zuckerstich hervorgerufene Glucosurie (Neubauer auch auf die Hyperglykämie) untersucht, und beide fanden eine stark hemmende Wirkung. Ein Vergleich allein zwischen der Wirkung des Chlorals auf diese Formen des experimentellen Diabetes würde jedoch nicht genügen. Zum Vergleich ist auch eine Untersuchung der Wirkung des Chlorals auf andere Formen der Hyperglykämie erforderlich, wo das Adrenalin keine Rolle spielt, und hierzu könnte man passend die Aderlaßhyperglykämie anwenden, die genau studiert und leicht zu erzeugen ist.

Gegen die Auffassung, daß der Zuckerstich ein Adrenalindiabetes sei, würde sprechen: 1. daß Chloral verschieden auf die drei Formen wirkte, und 2. daß Chloral auf die Aderlaß- und Zuckerstichhyperglykämie dieselbe, aber auf die Adrenalinhyperglykämie eine andere Wirkung hätte.

Für die genannte Auffassung würde dagegen sprechen, daß Chloral sich der Aderlaßhyperglykämie und dem Adrenalindiabetes gegenüber in gleicher, der Aderlaßhyperglykämie gegenüber aber in anderer Weise verhalte.

Wenn aber Chloral auf die drei Formen die gleiche Wirkung hätte, könnten wir die Frage auf diesem Wege nicht aufklären.

---

[1]) Eckhardt, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmak. 12, 276, 1880.
[2]) Neubauer, diese Zeitschr. 43, Heft 5 u. 6, 1912.

II.

a) Methodik.

Zur Bestimmung des Blutzuckers wurde Bangs Mikromethode[1]) benutzt. Diese bietet den großen Vorteil dar, daß zu einer Bestimmung nur ca. 100 mg Blut angewandt werden sollen. Eine so geringe Menge spielt keine Rolle für die Blutzuckerkonzentration im Gegensatz zu den größeren Blutmengen, die bei anderen Verfahren angewandt werden, indem schon ein Aderlaß von ca. 10 g Blut bei kleineren Versuchstieren, wie Kaninchen, eine Hyperglykämie ergibt. Der wichtigste Vorzug der Methode ist, daß sie zu Serienuntersuchungen benutzt werden kann, so daß wir eine Hyperglykämie von Anfang bis zu Ende verfolgen können.

Der Zucker wird durch Titrierung bestimmt. Der Zucker reduziert eine Kupferlösung, die aus Kupfervitriol, Kaliumbicarbonat, Kaliumcarbonat und Kaliumchlorid hergestellt ist. Das durch die Reduktion gebildete Kupferoxydul wird bestimmt, indem es wieder zu Cuprisalz durch $^{n}/_{100}$-Jod[2]) oxydiert wird. Da nur ca. 100 mg Blut angewendet werden, sollen also Zuckermengen von einem Bruchteil eines Milligramms bestimmt werden. Nach Bang können so kleine Zuckermengen mit $^{1}/_{50}$ bis $^{1}/_{100}$ mg Genauigkeit bestimmt werden, was meine Versuche bestätigen teils durch Bestimmung reiner Zuckerlösungen, teils durch Bestimmung abgewogener Mengen von Blut, zu dem bekannte Zuckermengen zugesetzt werden.

Tabelle I verzeichnet Bestimmungen von Zucker in bekannter Lösung, bestehend aus 10 cg reinem, mehrmals umkrystallisiertem, bei 100° getrocknetem Traubenzucker in 100 ccm Wasser. Von dieser Lösung werden verschiedene Mengen abgemessen, in denen der Zucker bestimmt wird.

---

[1]) Bang, Der Blutzucker S. 20.

[2]) Die Jodlösung ist aus ca. 2 ccm 2%igem Kaliumjodat, ca. 2 g Jodkalium und 10 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure, bis auf 100 ccm aufgefüllt, hergestellt. Prof. Bang wendet selbst eine solche Lösung an, irrtümlich lautet die Angabe in „Der Blutzucker“ aber 4 g Jodkalium. Dadurch erhält man zu niedrige Werte.

Tabelle I.

Zucker-menge mg	Gebraucht $^{n}/_{100}$-Jod in ccm						Durchschnittl. Werte Eigene Versuche ccm	Bangs Versuche ccm
0,05	0,17	0,17	0,16	0,17	0,16	0,17	0,17	0,18
0,09	0,26	0,25	0,25	—	—	—	—	—
0,10	0,25	0,26	0,25	0,27	0,26	0,27	0,26	0,26
0,15	0,35	0,35	—	—	—	—	0,35	0,36
0,20	0,47	0,47	0,45	0,49	0,46	0,42	0,47	0,47
0,30	0,68	0,65	0,67	0,69	0,70	—	0,68	0,69
0,40	0,90	0,87	0,90	0,92	0,90	0,89	0,90	0,91
0,50	1,11	1,09	1,12	1,13	—	—	1,11	1,12

Wie man sieht, herrscht zwischen Bangs und meinen Werten gute Übereinstimmung, und nirgends ist der Unterschied größer als 0,04 ccm Jod. Setzen wir 0,01 mg Zucker = 0,02 ccm Jod — wie bei Bang —, so beträgt der Maximalfehler 0,02 mg Zucker. In den 37 in der Tabelle angeführten Fällen findet sich dieser Fehler zweimal, 0,65 statt 0,69 und 0,87 statt 0,91; sonst ist der Fehler kleiner.

In 6 Fällen wurde im defibrinierten Blut die Zuckermenge nach der Mikromethode bestimmt; danach wurden abgewogene Mengen Zucker zugesetzt, und es fand wieder Bestimmung nach derselben Methode statt.

Tabelle II.

Fall	Blutmenge g	Präf. Zucker %	Zugesetzter Zucker g	Gefunden %	Berechnet %
1	9,8468	0,15	0,0106	0,24	0,25
2	8,3093	0,18	0,0204	0,425	0,43
3	9,4637	0,18	0,0108	0,30	0,31
4	9,7811	0,13	0,0099	0,23	0,23
5	12,4586	0,15	0,0217	0,35	0,34
6	8,9621	0,09	0,0091	0,194	0,191

Die angegebenen Werte des Zuckers im Blut sind Durchschnittszahlen von zwei oder drei Bestimmungen, mit Ausnahme von 3, wo nur Einzelbestimmungen stattfanden. Die einzelnen Werte lagen höchstens 0,02 % über oder unter der berechneten

Zahl, mit Ausnahme von 2, wo bei der einen Bestimmung 0,40%, bei der anderen 0,45% gefunden wurden gegen 0,43% berechnet, was ein sehr geringer Fehler ist.

In betreff der näheren Einzelheiten der Methode verweise ich auf Bangs Abhandlung. Die darin gegebenen Anweisungen sind befolgt worden. Die Technik ist verhältnismäßig einfach, und es lassen sich in ein paar Stunden ca. 10 Bestimmungen ausführen.

Die Vorzüge der Mikromethode vor den übrigen Blutzuckerbestimmungsmethoden sind 1. ihre Anwendbarkeit zu Serienuntersuchungen, da zu einer Bestimmung nur wenig Blut gebraucht wird, 2. die einfache Technik.

Schließlich mag noch hervorgehoben werden, daß die Mikromethode mit ebenso großer Genauigkeit arbeitet wie die übrigen Methoden, und zwar mit einem Fehler von ca. 10% bei den gewöhnlichen Werten; statt 0,1 mg Zucker in 100 mg Blut, können wir erwarten, 0,09 oder 0,11% zu finden; bei größeren Werten ist der Fehler kleiner.

Als Versuchstiere wurden Kaninchen angewandt.

b) Die Blutzuckerkonzentration bei Kaninchen.

Die Blutzuckermenge schwankt nach den Angaben verschiedener Autoren von 0,07 bis 0,16%. Nach Bangs früherer Methode betrug der Durchschnitt von Andersons und Erlandsens[1] 20 Bestimmungen an normalen Kaninchen 0,12 bis 0,13%. Bang[2] hat mit der Mikromethode den Blutzucker an 40 Kaninchen untersucht; er fand durchschnittlich 0,10%.

Bei meinen Versuchen untersuchte ich meistens den Blutzucker der Kaninchen mehrmals, bevor ich zu den verschiedenen Eingriffen, wie Injektion von Chloral, Adrenalin usw., schritt, um sicher zu sein, daß die Blutzuckerkonzentration sich unverändert halte oder daß sie nur unbedeutend schwanke. Die Tiere hatten sich dann mindestens 12 Stunden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur aufgehalten. In den Fällen 2 und 12 erhielten die Tiere Futter zwischen den Bestimmungen.

---

[1]) Erlandsen, diese Zeitschr. 23, 339, 1910.

[2]) Bang, Der Blutzucker S. 31.

Tabelle III.

Fall	1. Bestimmung		2. Bestimmung		3. Bestimmung	
	Zeitpunkt	Blutzucker %	Stunden später	Blutzucker %	Stunden später	Blutzucker %
1	27. X. 9 nachm.	0,12	12	0,12	3	0,10
2	29. X. 10 vorm.	0,09	3	0,16	—	—
3	3. XI. 11 „	0,18	1	0,14	—	—
4	4. XI. 12 „	0,13	1/4	0,14	—	—
5	5. XI. 10 1/2 „	0,13	3	0,13	—	—
6	6. XI. 12 1/2 nachm.	0,08	1	0,09	—	—
7	16. XI. 2 1/2 „	0,095	1	0,10	1	0,09
8	27. XI. 10 vorm.	0,12	1	0,12	2	0,12
9	28. XI. 10 „	0,18	1	0,13	1	0,10
10	2. XII. 10 „	0,12	1	0,12	—	—

In einem anderen Falle wurden die Bestimmungen 9 bis 10 Stunden hindurch ungefähr stündlich wiederholt (die Kaninchen erhielten kein Futter zwischen den Bestimmungen).

Fall 11. 28. XII. 1 Uhr. nachm. 0,11 %, 0,12 % (1 3/4 Std. später), 0,11 % (1 Std. später), 0,10 % (1 Std. später), 0,12 % (1 Std. später), 0,11 % (1 Std. später), 0,10 % (1 3/4 Std. später), 0,12 % (2 1/2 Std. später).

Schließlich führe ich einen Fall an, wo mit Zwischenräumen von vielen Stunden Bestimmungen ausgeführt wurden.

Fall 12. 25. X. 11 Uhr vorm. 0,15 %, 0,12 % (36 Std. später), 0,13 % (24 Std. später), 0,13 (24 Std. später), 0,12 % (12 Std. später).

Wie man sieht, entsprechen die genannten Werte ganz den früher angegebenen. Die mittlere Zahl der 38 angeführten Bestimmungen ist 0,11 bis 0,12 %. Die Schwankungen bei den einzelnen Tieren betragen gewöhnlich höchstens 0,02 %, außer in den Fällen 2, 9 und 12. Hier wurden die Bestimmungen, kürzere Zeit, nachdem die Tiere gefressen hatten, als in den übrigen Fällen angestellt, während ich sonst ein paar Stunden wartete, bevor die Bestimmungen ausgeführt wurden; darin wird die Erklärung zu suchen sein. Es zeigt sich nämlich, daß auch bei normalen Tieren unmittelbar nach den Mahlzeiten, auch wenn diese nicht besonders zuckerhaltig sind, wie Bangs[1]) Fütterungsversuche mit Stärke und stärkehaltiger Kost es dar-

[1]) Bang, Der Blutzucker S. 68.

tun, eine kurze Hyperglykämie vorkommen kann. Aus Bangs Versuchen scheint hervorzugehen, daß man den störenden Einfluß dieser alimentären Hyperglykämie auf andere Hyperglykämien vermeiden kann, wenn man mit deren Hervorrufen wartet, bis ein paar Stunden nach der Mahlzeit der Tiere verstrichen sind. Diese Maßregel wurde bei den im folgenden erwähnten Versuchen beobachtet.

Auch unter anderen Verhältnissen habe ich bei Kaninchen eine Hyperglykämie angetroffen, die gleichfalls störend wirken konnte, und zwar wegen eines psychischen Affekts. Wenn die Tiere auf dem Operationstisch ausgespannt waren, ohne daß sonst etwas mit ihnen geschah, trat mitunter eine recht bedeutende Hyperglykämie auf. Unter solchen Umständen zeigen die Kaninchen das Bild eines starken Schreckens, und es ist wohl die natürlichste Annahme, diesen als Ursache der Hyperglykämie zu betrachten, namentlich da man ja bei anderen Tieren (Katzen) die Glucosurie infolge von Schreck kennt.

In 4 Fällen waren die Kaninchen in Rückenlage auf dem Operationstisch ausgespannt. Die Blutzuckerwerte sind in der Tabelle IV verzeichnet.

Tabelle IV.

	Fall			
	1	2	3	4
	%	%	%	%
Präf. Blutzucker	0,10	0,12	0,12	0,11
5 Min. nachdem die Tiere auf dem Tisch angebracht waren	0,13	—	—	—
10 Min. später	0,17	0,18	0,145	0,13
30 „ „	0,22	0,18	0,15	0,17
Die Tiere werden vom Tisch entfernt.				
30 Min. später	0,23	0,17	—	0,14
60 „ „	0,19	—	0,12	—
2 Std. „	0,12	0,10	—	0,09

In allen 4 Fällen tritt bereits 10 Minuten, nachdem die Tiere auf dem Operationstisch angebracht worden sind, eine Hyperglykämie auf, die bei 1 ganz deutlich, bei 3 gering ist. In anderen Fällen (siehe die Zuckerstichversuche) trat in einem Falle eine Steigerung von 0,13% auf 0,20% ein, in einem

anderen Falle fast keine, d. h. von 0,09 $^0/_0$ auf 0,10 $^0/_0$. Daß diese Schreckhyperglykämie nicht konstant ist, zeigen auch zahlreiche Versuche von Bang, der nur ein paarmal eine solche Steigerung beobachtet hat (private Mitteilung von Prof. Bang); man muß aber auf eine solche gefaßt sein.

Bevor wir zu unserer Hauptfrage, den Einfluß des Chlorals auf verschiedene experimentelle Hyperglykämien, übergehen, müssen wir untersuchen, ob das Chloral die Blutzuckerkonzentration beeinflußt.

III.

Der Einfluß des Chlorals auf die Blutzuckerkonzentration.

Es wurde 3 Kaninchen bzw. 1 g, 1 g und 1,5 g Chloral in ca. 10 ccm Wasser gelöst, subcutan injiziert; einem 4. Kaninchen wurde 1,25 g, gleichfalls in ca. 10 ccm Wasser gelöst, per rectum eingeflößt. Die Blutzuckerwerte sind in Tabelle V verzeichnet.

Tabelle V.

Fall	1	2	3	4
Chloralmenge	1 g Chloral subcutan injiziert. ca. 2 stündige Narkotisierung. $^0/_0$	1,5 g Chloral subcutan injiziert. Tiefe Narkose; starb nach ca. 2 Std. $^0/_0$	1 g Chloral subcutan injiziert. Vom Chloral wenig beeinflußt. $^0/_0$	1,25 g Chloral per rectum. ca. $1^1/_2$ stündige Narkotisierung. $^0/_0$
Präf. Blutzucker	0,10	0,11	0,15	0,12
$^1/_4$ Std. später .	—	—	0,17	0,12
$^1/_2$ „ „ .	0,14	0,16	—	0,12
$^3/_4$ „ „ .	—	—	0,16	0,11
1 „ „ .	0,14	0,22	—	0,13
$1^1/_4$ „ „ .	—	—	0,165	—
$1^1/_2$ „ „ .	0,11	0,23	—	0,15
2 „ „ .	0,11	—	0,14	0,14
3 „ „ .	0,07	—	0,14	0,13
4 „ „ .	0,09	—	0,14	0,11
5 „ „ .	—	—	0,13	—
6 „ „ .	—	—	0,13	—

Wie man sieht, tritt in allen 4 Fällen Hyperglykämie ein. Am größten ist diese bei 2, wo das Tier nach ca. 2 Stunden starb, nachdem der Blutzuckerprozentsatz von 0,11 $^0/_0$ auf 0,23 $^0/_0$, also um über 100 $^0/_0$ gestiegen war; in den anderen

Fällen ist die Steigerung geringer, aber unzweifelhaft. In diesen Fällen waren die Tiere auch weit weniger vom Chloral beeinflußt als im ersteren Falle.

Es fragt sich nun, ob tatsächlich eine Steigerung der Blutzuckermenge stattfindet, oder ob im Blut nur andere reduzierende Stoffe auftreten, in diesem Falle z. B. Urochloralsäure. Fall 1 scheint uns darüber aufklären zu können, indem auf die vermutete Hyperglykämie eine Hypoglykämie folgt, welches Verhältnis wir ja bei anderen tatsächlichen Hyperglykämien antreffen.

Fall 4, wo das Chloral per rectum eingegeben wurde, weist ein eigentümliches Verhalten auf. Das Tier geriet ebenso schnell in Narkose, wie diejenigen, denen das Chloral subcutan injiziert wurde, aber die Zunahme der Blutzuckermenge trat erst bedeutend später ein als bei den übrigen Tieren und war am stärksten, nachdem beim Tiere vollständig natürliche Verhältnisse eingetreten waren.

Es geht also aus diesen Versuchen hervor, daß Chloral bei Kaninchen Hyperglykämie hervorruft.

IV.

Der Einfluß des Chloralhydrats auf die Hyperglykämie nach Adrenalininjektion, Zuckerstich und Aderlaß.

Bevor man etwas über den Einfluß des Chlorals auf die Hyperglykämien nach Adrenalininjektion, Zuckerstich und Aderlaß entscheiden kann, muß man die gewöhnliche Größe und Dauer dieser Hyperglykämien kennen. Es liegen zahlreiche Untersuchungen darüber vor, ich habe diese durch einige Versuche ergänzt und sodann die Wirkung des Chlorals untersucht.

a) Die Hyperglykämie nach subcutaner Injektion von Adrenalin.

Erlandsen[1]) fand in Übereinstimmung mit anderen Angaben, daß die Hyperglykämie bei Kaninchen nach Injektion von 1 mg Adrenalin pro Kilogramm wenigstens 4 Stunden dauerte, und das Maximum bei 0,29% nach 30 Minuten. Bang[2]) fand in 2 Fällen (Mikromethode) nach Injektion von

[1]) Erlandsen, diese Zeitschr. 24, I, 1910.
[2]) Bang, Der Blutzucker S. 89.

1 mg Adrenalin, daß die Blutzuckermenge schnell zunahm, nach 2 bis 3 Stunden das Maximum erreichte und nach kürzerer Zeit wieder etwas langsamer, als sie zugenommen hatte, abnahm. Bei zwei Versuchen injizierte ich gleichfalls 1 mg Adrenalin subcutan und fand die in Tabelle VI angeführten Blutzuckerwerte. Die von Fall 2 sind auch auf der Kurventafel I verzeichnet.

Tabelle VI.

	Fall	
	1	2
Präf. Blutzucker	0,14 %	0,10 %
Injiziert Adrenalin	1,00 mg	1,00 mg
Blutzucker 5 Min. später . .	0,16 %	0,11 %
" 15 " " . .	0,20	0,15
" 30 " " . .	0,20	0,29
" 45 " " . .	0,26	—
" 1 Std. später .	0,27	0,42
" 1½ " " .	0,29	0,40
" 2 " " .	0,27	0,44
" 2½ " " .	0,27	—
" 3 " " .	0,24	0,44
" 4 " " .	0,20	0,23
" 5 " " .	0,16	0,13
" 6 " " .	—	0,10
" 6½ " " .	0,09	—

5 Minuten nach der Injektion beobachteten wir eine unbedeutende Zunahme des Blutzuckers. Das Maximum wird nach 2 bis 3 Stunden bei 0,29 und 0,44 % erreicht. Nach einigen Stunden fängt die Hyperglykämie zu schwinden an und ist nach ca. 6 stündigem Bestehen ganz geschwunden; wie man sieht, herrscht gute Übereinstimmung mit Bangs Versuchen. Aus diesen Versuchen läßt sich schließen, daß die Hyperglykämie nach Injektion von 1 mg Adrenalin ca. 7 Stunden dauert, und daß die Blutzuckermenge selten ca. 0,50 % übertrifft, übrigens aber bedeutend schwankt.

b) Der Einfluß des Chlorals auf die Hyperglykämie nach subcutaner Adrenalininjektion.

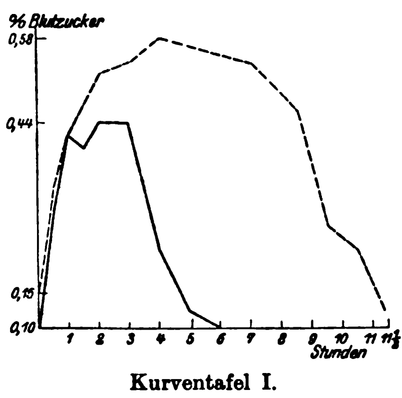
In 6 Fällen wurde 1 mg Adrenalin subcutan injiziert, nachdem zuvor verschiedene Mengen Chloralhydrat injiziert worden waren. Die Resultate der Blutbestimmungen sind in Tabelle VII, die von Fall 2 auch auf der Kurventafel I verzeichnet.

Tabelle VII.

Fall	1	2	3	4	5	6
Chloralmenge	1,2 g subcutan während d. Vers. narkotisiert, starb nach ein paar Stunden	2,6 g 7—8 stündige Narkotisierung	2,4 g ca. 3 stündige Narkotisierung	0,8 g Nur wenig vom Chloral beeinflußt		2 g ca. 5 stündige Narkotisierung
Präf. Blutzucker . . .	0,09 %	0,13 %	0,12 %	0,12 %	0,08 %	0,12 %
	15 Min. nach Chloralinjektion	3/4 Std. nach Chloralinj.	30 Min. nach Chloralinj.	20 Min. nach Chloralinj.	30 Min. nach Chloralinj.	
Blutzucker	0,10 %	0,16 %	0,14 %	0,17 %	0,10 %	—
Adrenalinmenge . . .	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg
Blutzuck. 5 Min. später	0,11 %	0,18 %	0,17 %	0,18 %	0,14 %	—
" 15 " "	0,10	0,25	0,17	0,17	—	—
" 30 " "	0,12	0,33	0,22	0,20	0,18	—
" 45 " "	0,14	—	—	0,25	0,20	—
" 1 Std. "	0,14	0,42	0,30	—	0,29	—
" 1½ " "	0,16	—	0,29	0,28	0,30	—
" 2 " "	0,17	0,52	0,30	—	—	—
" 2½ " "	0,19	—	—	—	0,34	—
" 3 " "	0,22	0,54	0,33	—	0,29	0,46 %
" 4 " "	0,25	0,58	0,36	—	0,30	—
" 5 " "	0,31	—	0,31	—	0,23	0,41
" 6 " "	0,27	0,55	0,29	—	0,19	—
" 7 " "	0,30	0,54	0,19	—	0,15	—
" 8 " "	—	—	0,12	—	0,10	—
" 8½ " "	—	0,46	—	—	—	—
" 9 " "	0,32	—	—	—	—	—
" 9½ " "	—	0,27	—	—	—	—
" 10 " "	0,26	—	—	—	—	—
" 10½ " "	—	—	—	—	—	—
" 11 " "	0,33	0,23	—	—	—	—
" 11½ " "	—	0,12	—	—	—	—

In den Fällen 1 und 2 hatte das Chloral einen bedeutenden Einfluß auf die Dauer, in Fall 2 auch auf die Größe der Hyperglykämie; diese erstreckte sich über 10 Stunden gegen ca. 7 Stunden nach alleiniger Adrenalininjektion; Fall 2 weist Blutzuckerwerte von ca. 0,55 % auf. In beiden Fällen waren die Tiere sehr stark vom Chloral beeinflußt, in Fall 1 starb das Kaninchen ein paar Stunden nach dem Versuch. Auch in Fall 3 scheint die Dauer der Hyperglykämie verlängert; hier ist die Chloralwirkung geringer, und ganz gering ist sie bei 4 und 5. Bei 5 ist die Hyperglykämie einer gewöhnlichen Adrenalinhyperglykämie ganz ähnlich, was auch von Fall 4 gilt, wo der Versuch nicht zu Ende geführt werden konte, da es unmöglich war, den Ohren des Kaninchens mehr Blut zu entnehmen.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das Chloral in stark narkotisch wirkenden Gaben auf die Hyperglykämie nach Adrenalininjektion einen steigernden Einfluß ausübt.



Kurventafel I.

——— Blutzucker nach Adrenalininjekt.
------- Blutzucker nach Chloral- u. Adrenalininjektion.

In den Fällen 2, 4 und 6 wurde der Harn untersucht. Bei 2 war der Harn 1 Stunde nach Anfang des Versuchs zuckerfrei, 3 Stunden später enthielt er 0,2%, 5 Stunden später 1,4%. Bei 4 war der Harn nach 2 und 5 Stunden nach Anfang des Versuchs zuckerfrei. Bei 6 enthielt der Harn nach 2 und 5 Stunden 1,9% und 4,3%. Die Versuche sind zu gering an Zahl, um Schlußfolgerungen über den Einfluß des Chlorals auf die Adrenalinglucosurie zu ermöglichen.

c) Die Hyperglykämie nach Zuckerstich.

Nach den verschiedenen Angaben schwankt die Blutzuckermenge nach Zuckerstich an Kaninchen recht bedeutend, von ca. 0,20 bis ca. 0,50%. Claude Bernard fand in einem Falle 0,25%. Bang[1]) und seine Schüler fanden in fünf Versuchen Blutzuckerwerte bis 0,39%. Bang[2]) hat auch mittels der Mikromethode Versuche angestellt. Der Blutzucker nahm schnell zu und erreichte im Laufe von 1 Stunde fast das Maximum, nahm in den folgenden 4 Stunden noch unbedeutend zu und darauf schnell ab. Die Hyperglykämie dauerte ca. 6 Stunden. Ich habe zwei Versuche angestellt. Bei 1 enthielt der Harn 1 und 2 Stunden nach dem Eingriff 0,1% und 0,3% Zucker; bei 2 eine Stunde nach dem Eingriff 0,4%. Letzterer Versuch kann jedoch nicht als normaler Versuch betrachtet

[1]) Bang, Ljungdahl und Bohm, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 10, 1, 1907.

[2]) Bang, Der Blutzucker S. 100.

werden, da ich auch am Tage zuvor Zuckerstich bei Chloralnarkose an demselben Kaninchen ausgeführt hatte. Ich habe den Versuch aber doch anführen wollen, erstens weil die Hyperglykämie zum Teil der von 1 entspricht, und sodann, weil der Versuch für die Frage vom Einfluß der Furcht auf die Blutzuckerkonzentration von Interesse ist. Die Blutzuckerwerte sind in Tabelle VIII, die von 1 auch auf der Kurventafel II verzeichnet.

Tabelle VIII.

	Fall 1 %	Fall 2 %
Präf. Blutzucker	0,09	0,13
Blutzucker 10 Min. nachdem das Tier auf dem Tische angebracht worden war	0,10	0,20
Blutzucker vor dem Zuckerstich	0,13	0,23
" 5 Min. später	0,21	0,26
" 15 " "	0,24	0,39
" 30 " "	—	0,30
" 45 " "	0,25	—
" 1 Std. "	—	0,26
" $1^1/_2$ " "	0,29	0,27
" 2 " "	0,19	0,22
" 3 " "	0,19	0,15
" 4 " "	0,15	0,11
" 5 " "	0,12	—
" 6 " "	0,11	—
" 7 " "	0,10	—

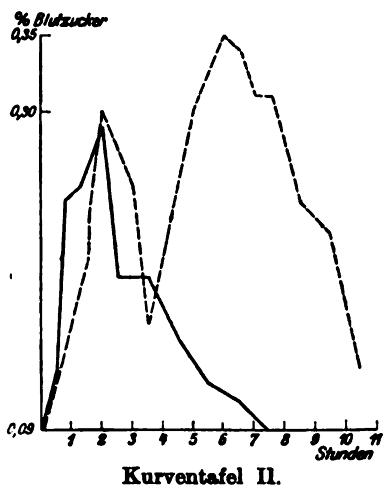
Bei Fall 1 lag das Kaninchen 10 Minuten auf dem Operationstisch ausgespannt, bevor der Eingriff stattfand. Es trat dabei nur eine unbedeutende Vermehrung der Blutzuckermenge ein. Auch durch die Operation selbst wurde der Blutzucker nicht stark beeinflußt, indem sich im Laufe der 20 Minuten, die die Freilegung des vierten Ventrikels beanspruchte, nur eine Steigerung von 0,10 auf 0,13% ergab. 5 Minuten nach dem Zuckerstich ist der Blutzucker auf 0,21% gestiegen und im Laufe von $1^1/_2$ Stunden ist das Maximum (0,29%) erreicht. Danach nimmt die Hyperglykämie ab und ist nach 6 Stunden verschwunden. Bei Fall 2 trat aber, nur weil das Tier auf dem Tisch ausgespannt lag, in weniger als 10 Minuten eine Steigerung von 0,13 auf 0,20% ein. Eine Viertelstunde nach dem Stich ist der Blutzucker von 0,23 auf 0,39% vermehrt. Die Hyperglykämie dauerte ca. 4 Stunden.

Nach den angeführten Versuchen scheint die Hyperglykämie nach Zuckerstich im allgemeinen bis 7 Stunden zu dauern und der größte Zuckerwert ca. 0,50 % zu betragen.

d) Der Einfluß des Chlorals auf die Hyperglykämie nach Zuckerstich.

Wie früher erwähnt, hat Eckhardt und später Neubauer den Einfluß des Chlorals auf Glucosurien nach Zuckerstich untersucht. Beide kamen zu dem Resultat, daß die Glucosurie entweder ganz ausblieb, oder daß die ausgeschiedene Zuckermenge minimal war (Neubauer fand in 4 Fällen 0,054, 0,0162, 0,002 und 0 g Zucker im Harn). Neubauer hat außerdem in einem Falle das Verhalten des Blutzuckers geprüft und gefunden, daß die Hyperglykämie, wo nicht aufgehoben, so doch gehemmt wurde.

Wie die genannten Verfasser injizierte ich in 6 Fällen 1 bis 2,5 g Chloral subcutan. $^1/_2$ bis 1 Stunde darauf fand Blutbestimmung und sodann der Eingriff statt. Bei Fall 2 wurde außerdem 6 Stunden nach dem Zuckerstich 1 g Chloral injiziert. Die Blutzuckerbestimmungen sind in Tabelle IX, die von Fall 1 zugleich auf der Kurventafel II verzeichnet.



Kurventafel II.
——— Blutzucker nach Zuckerstich.
- - - - Blutzucker nach Chloralinjektion und Zuckerstich.

Bei Fall 1 und 2, wo die Tiere vom Chloral stark narkotisiert waren, sowie bei 3, wo die narkotische Wirkung weniger ausgesprochen war, hatte das Chloral eine unzweifelhaft verstärkende Wirkung auf die Dauer der Hyperglykämie, bei 2 möglicherweise auch auf deren Größe. Die Hyperglykämie dauerte bei 2 und 3 über 10 Stunden, bei 1 ca. 8 Stunden; bei 2 fand ich 6 Stunden nach dem Eingriff einen Blutzuckerwert von 0,56 %. Es wurde zu der Zeit wieder Chloral (1 g)

Tabelle IX.

Fall	1	2	3	4	5	6
Chloralmenge	2 g	2,5 g	1,5 g	1,5 g	1 g	1,5 g
	4—5 stündige Narkotisierung		2—3 stündige Narkotisierung		Nur wenig vom Chloral beeinflußt	
Präf. Blutzucker	0,09 %	0,10 %	0,10 %	0,12 %	0,11 %	0,12 %
	45 Min. nach Chloralinj.	1 Std. nach Chloralinj.	30 Min. nach Chloralinj.	40 Min. nach Chloralinj.	45 Min. nach Chloralinj.	30 Min. nach Chloralinj.
Blutzucker	0,14 %	0,12 %	0,13 %	0,13 %	0,13	0,17 %
Blutzucker vor d. Zuckerstich	0,20	0,15	0,20	0,30	0,20	0,17
„ 5 Min. später . .	0,23	0,29	0,22	—	0,23	—
„ 15 „ „ . .	0,29	0,31	0,26	0,35	0,31	0,19
„ 30 „ „ . .	0,30	0,30	0,30	0,35	0,33	0,22
„ 1 Std. „ . .	—	0,31	0,23	0,38	0,31	0,17
„ 1½ „ „ . .	0,25	0,31	0,16	0,39	0,31	0,17
„ 2 „ „ . .	0,16	0,30	—	—	—	—
„ 2½ „ „ . .	—	—	—	0,34	0,31	0,16
„ 3 „ „ . .	—	0,28	—	—	—	—
„ 3½ „ „ . .	0,30	—	0,19	0,24	0,35	0,13
„ 4½ „ „ . .	0,35	0,29	0,16	0,15	0,29	0,10
„ 5 „ „ . .	0,34	—	—	—	—	—
„ 5½ „ „ . .	0,31	0,56	0,21	0,15	0,17	—
„ 6 „ „ . .	0,31	—	—	—	—	—
„ 6½ „ „ . .	—	0,22	0,23	—	0,14	—
„ 7 „ „ . .	0,24	0,19	—	0,10	—	—
„ 7½ „ „ . .	—	—	0,30	—	0,115	—
„ 8 „ „ . .	0,22	0,16	0,30	—	—	—
„ 8½ „ „ . .	0,17	—	0,23	—	0,11	—
„ 9 „ „ . .	0,13	0,16	—	—	—	—
„ 9½ „ „ . .	—	—	0,24	—	—	—
„ 10 „ „ . .	—	·0,17	0,24	—	—	—
„ 11 „ „ . .	—	0,19	—	—	—	—
„ 12 „ „ . .	—	0,22	—	—	—	—
„ 12½ „ „ . .	—	0,25	—	—	—	—
Zucker im Harn ausgeschieden	2,665 g	0,336 g	0	0,34 g	0,667 g	0

injiziert; danach sank der Blutzucker auf 0,22 %, aber nachdem er weiter auf 0,16 % gesunken war, stieg er wieder bis auf 0,25 %. — Bei Fall 4 und 5, wo die Tiere ca. 2 und ca. 1½ Stunden narkotisiert waren, dauerte die Hyperglykämie länger als bei dem reinen Zuckerstichversuch; der Unterschied ist jedoch nicht so groß, daß man sich mit Bestimmtheit über eine Verstärkung der Hyperglykämie bei diesen Versuchen aussprechen kann.

Als weiteren Beweis eines Einflusses von Chloral auf die Dauer der Hyperglykämie von Fall 4 führe ich folgenden Versuch an. Am Tage nach dem Zuckerstich bei Chloralnarkose

fand wieder ein Zuckerstich statt. Das Tier verhielt sich zwischen den beiden Eingriffen anscheinend ganz natürlich und fraß normal. Die Blutzuckerbestimmung findet sich in Tabelle VIII. Die Hyperglykämie dauerte 4 Stunden nach Zuckerstich allein, aber ca. 7 Stunden nach Zuckerstich und Chloralinjektion. Selbstredend kann man jedoch aus einem solchen Versuche nichts Bestimmtes schließen. Bei Fall 6 scheint das Chloral gar keinen Einfluß auf die Hyperglykämie gehabt zu haben. Das Tier war ca. $1^1/_2$ Stunde narkotisiert.

Schließlich soll ein Fall besprochen werden, den ich von den übrigen absondern zu müssen glaube. Die präformierte Blutzuckermenge betrug nämlich 0,20 $^0/_0$, und es trat während der Operation Blutung ein. Vor dem Zuckerstich war der Blutzucker auf 0,40 $^0/_0$ gestiegen, und nach demselben erreichte er Werte bis 0,75 $^0/_0$. Es wurden 0,68 g Zucker im Harn ausgeschieden.

Es scheint hieraus hervorzugehen, daß das Chloral auf die Zuckerstichhyperglykämie verstärkend wirkt, wie auf die Adrenalinhyperglykämie, wenn es in stark narkotisch wirkenden Gaben gegeben wird.

Die Versuche bestätigen Eckhardts und Neubauers Annahme nicht, daß das Chloral auf die Zuckerstichglucosurie hemmend wirkt. Von 6 Fällen unterblieb die Glucosurie in 2; in den 4 übrigen wurden recht bedeutende Mengen Zucker ausgeschieden, in einem Falle gar 2,665 g, was mehr ist, als bei irgendeinem von Neubauers reinen Zuckerstichversuchen, in den 3 übrigen Fällen 0,336, 0,34 und 0,667 g.

e) Die Aderlaßhyperglykämie.

Erlandsen[1]) hat eine Reihe von Untersuchungen über Dauer und Größe der Aderlaßhyperglykämie zusammengestellt und auch selbst Versuche darüber angestellt. Auch hat Bang[2]) mittels der Mikromethode Untersuchungen über diese Hyperglykämie unternommen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, daß Aderlaß an Kaninchen konstant Hyperglykämie hervorruft; sie setzt bereits nach 5 Minuten ein, erreicht ihr Maximum ca. $^1/_2$ Stunde nach dem Aderlaß, hält sich ohne größere

[1]) Erlandsen, diese Zeitschr. 23, 340, 1910.
[2]) Bang, Der Blutzucker S. 111.

Schwankungen 1 bis $1^1/_2$ Stunden, um sodann recht schnell abzunehmen. Die Hyperglykämie dauert ein paar Stunden, bei Bangs Versuchen etwas länger, bis 4 Stunden. Schließlich soll hervorgehoben werden, daß die Größe des Blutverlustes für die Größe und Dauer der Hyperglykämie keine Rolle spielt. Selbst habe ich drei Versuche angestellt. Es wurden der Carotis 17, 12 und 19 g Blut entnommen. Die Blutzuckerbestimmungen sind in Tabelle X, die von Fall 1 auch auf der Kurventafel III verzeichnet.

Tabelle X.

	Fall 1	Fall 2	Fall 3
Präf. Blutzucker	0,12 %	0,12 %	0,10 %
Blutmenge durch Aderlaß	17 g	12 g	19 g
Blutzuck. unmittelbar danach	0,15 %	—	—
Blutzucker 5 Min. später	—	0,12 %	0,14 %
" 10 " "	0,17 %	0,15	0,13
" 15 " "	0,21	—	—
" 20 " "	—	0,15	0,20
" 30 " "	0,28	—	—
" 35 " "	—	0,16	0,14
" 45 " "	0,26	0,18	—
" 1 Std. "	0,22	0,20	—
" $1^1/_2$ " "	0,22	0,19	—
" 2 " "	0,14	0,15	—
" $2^1/_2$ " "	0,11	0,14	0,15
" 3 " "	0,10	0,15	—
" $3^1/_2$ " "	—	—	0,13
" 4 " "	0,12	0,15	—
" 5 " "	0,08	0,14	0,13
" 6 " "	0,10	—	0,10
" 7 " "	—	0,11	—

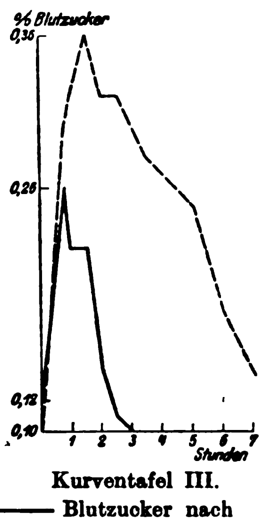
Fall 1 entspricht ganz der Beschreibung. Unmittelbar nach dem Aderlaß ist der Blutzucker auf 0,15 % gestiegen, gegen 0,12 % 10 Minuten früher, gleich nach Anfang der Operation. Die Hyperglykämie dauert 2 Stunden. Bei Fall 2 steigt der Blutzucker gleichfalls schnell auf 0,20 %; nach 2 Stunden hat er bis auf 0,15 % abgenommen, auf welcher Höhe er sich die folgenden Stunden hält. Fall 3 weist dagegen eine eigentümliche Hyperglykämieform auf. Wie bei den anderen Versuchen nimmt der Blutzucker schnell zu. Das Maximum (0,20 %) wird 20 Minuten nach dem Aderlaß erreicht. Nach $^1/_4$ Stunde hat er bis auf

0,14 $^0/_0$ abgenommen, wo er sich bei kleinen Schwankungen die folgenden 3 bis 4 Stunden hält. In allen drei Fällen ist die eigentliche Blutzuckerzunahme also ein paar Stunden nach dem Aderlaß geschwunden. Man könnte fragen, ob die Hyperglykämie vom Schrecken herrührt. Nach Fall 2 scheint dies nicht der Fall zu sein. $1^1/_2$ Stunden zuvor fand sich 0,10 $^0/_0$ Zucker im Blut; während der Operation unmittelbar vor dem Aderlaß 0,12 $^0/_0$ und 5 Minuten nach demselben noch immer 0,12 $^0/_0$; erst später setzte die Zunahme ein. 20 bis 25 Minuten hindurch, in denen das Tier auf dem Operationstisch ausgespannt lag und operiert wurde, fand also nur eine unbedeutende Zunahme der Blutzuckermenge statt.

Die Dauer der Hyperglykämie nach Aderlaß können wir also auf 4 Stunden ansetzen, die größte Blutzuckermenge auf 0,37 $^0/_0$, welcher Wert unter Erlandsens 24 zusammengestellten und eigenen Versuchen einmal vorkommt.

f) Der Einfluß des Chlorals auf die Aderlaßhyperglykämie.

Bei 4 Versuchen wurde bzw. 1,2, 0,9, 0,8 und 0,8 g Chloral, in ca. 10 ccm Wasser gelöst, subcutan injiziert, und 15 bis 45 Minuten später wurden der Carotis durch Aderlaß 13, 15, 10 und 12 g Blut entnommen.



Kurventafel III.
—— Blutzucker nach Aderlaß.
---- Blutzucker nach Chloralinjektion u. Aderlaß.

Die Blutbestimmungen sind in Tabelle XI, die von Fall 1 auch auf der Kurventafel III verzeichnet.

Wie man sieht, hatte das Chloral bei Fall 1 und 2 einen außerordentlich großen Einfluß auf die Dauer der Hyperglykämie, indem diese sich hier über 7 bis 8 Stunden erstreckt, gegen höchstens 3 bis 4 Stunden bei der reinen Aderlaßhyperglykämie. Auch an Größe scheint sie bei Versuch 1 zugenommen zu haben; der größte Blutzuckerwert beträgt hier 0,36 $^0/_0$. Bei einem von den von Erlandsen gesammelten Fällen von Aderlaßhyperglykämie findet sich, wie erwähnt,

Tabelle XI.

Fall	1	2	3	4
Chloralmenge	0,9 g 5stündige Narkotisierung	1,2 g 2—3stündige Narkotisierung	0,8 g Nur wenig vom Chloral beeinflußt	
Präf. Blutzucker	0,11 $^0/_0$	0,13 $^0/_0$	0,13 $^0/_0$	0,11 $^0/_0$
Blutzucker	10 Min. nach Chloralinjekt. 0,10 $^0/_0$	25 Min. nach Chloralinjekt. 0,18 $^0/_0$	15 Min. nach Chloralinjekt. 0,13 $^0/_0$	—
Aderlaßblutmenge . . .	13 g	ca. 15 g	10 g	12 g
Blutzuck. unmittelb. danach	—	0,24 $^0/_0$	0,15 $^0/_0$	—
Blutzucker 5 Min. später	0,12 $^0/_0$	—	0,17	0,13 $^0/_0$
" 10 " "	—	—	0,22	0,13
" 15 " "	0,15	0,21	—	0,13
" 20 " "	—	—	0,23	—
" 25 " "	0,17	—	—	—
" 30 " "	—	—	—	0,15
" 35 " "	0,21	0,22	0,21	—
" 40 " "	0,28	—	—	0,16
" 45 " "	—	—	—	—
" 1 Std. "	0,32	0,22	0,22	0,15
" 1½ " "	0,36	0,22	0,15	0,14
" 2 " "	0,32	0,20	0,16	—
" 2½ " "	0,32	—	0,12	—
" 3 " "	—	0,18	—	0,12
" 3½ " "	0,28	—	0,11	—
" 4 " "	—	0,18	—	0,12
" 4½ " "	—	—	0,11	—
" 5 " "	0,25	0,25	—	—
" 5½ " "	—	—	0,11	0,11
" 6 " "	0,18	0,21	—	—
" 6½ " "	—	—	—	—
" 7 " "	0,14	—	—	—
" 7½ " "	—	0,17	—	—
" 8½ " "	—	0,11	—	—

jedoch ein Wert von 0,37 $^0/_0$. Etwas Bestimmtes läßt sich also nicht hieraus schließen. Bei Fall 1 und 2 waren die Tiere vom Chloral stark beeinflußt. Bei Fall 3 verhielt sich die Hyperglykämie wie bei Aderlaß allein, wohingegen sie bei Fall 4 so gering war, daß man einen hemmenden Einfluß des Chlorals auf die Hyperglykämie annehmen möchte; jedoch findet sich unter den reinen Aderlaßversuchen, vgl. 3 hiervon, ein Fall mit ähnlicher geringer Hyperglykämie. In zwei von letzteren Fällen waren die Kaninchen vom Chloral nur wenig beeinflußt.

Wie bei der Hyperglykämie nach Adrenalininjektion und Zuckerstich wirkt das Chloral ver-

stärkend auf die Aderlaßhyperglykämie, wenn es in stark narkotisch wirkenden Gaben injiziert wird.

Die Erklärung der verstärkenden Wirkung des Chlorals auf die genannten Hyperglykämien liegt wahrscheinlich in dessen eigenem Vermögen, eine Hyperglykämie hervorrufen zu können. Wie die „reinen" Chloralversuche zeigen, ist die Hyperglykämie am größten, wo die narkotisierende Wirkung des Chlorals am ausgeprägtesten ist. Von den Adrenalin-, Piqûre- und Aderlaßversuchen, wo im voraus Chloral injiziert wurde, gilt das nämliche, daß die Hyperglykämie am meisten gesteigert ist, wenn die Tiere am stärksten narkotisiert sind. Diese Übereinstimmung zwischen den genannten Versuchen scheint darauf zu deuten, daß der verstärkende Einfluß des Chlorals auf die erwähnten Hyperglykämien als das Resultat einer Summation der Wirkung des Chlorals und der übrigen zur Hyperglykämie führenden Eingriffe zu betrachten ist.

Resümee.

Das Chloralhydrat ergibt Hyperglykämie (bei Kaninchen) und wirkt wahrscheinlich aus dem Grunde verstärkend auf die Hyperglykämie nach Adrenalininjektion, Zuckerstich und Aderlaß. Die verstärkende Wirkung ist dort am ausgesprochensten, wo das Chloral am stärksten narkotisierend wirkt. In vielen Fällen, wo die Kaninchen vom Chloral nur wenig beeinflußt werden, läßt sich nicht entscheiden, ob überhaupt eine Steigerung der Hyperglykämie vorliegt oder nicht. Da das Chloral also auf die Adrenalin-, Zuckerstich- und Aderlaßhyperglykämie dieselbe Wirkung hat, kann man auf diesem Wege nichts darüber erfahren, ob der Zuckerstich von einem Adrenalindiabetes herrührt.

Der größte Teil obiger Versuche wurde im Medizinisch-chemischen Institut in Lund, ein kleinerer Teil in der medizinischen Klinik der Universität Kopenhagen ausgeführt.

Prüfung der Kumagawa-Sutoschen Fettbestimmungsmethode hinsichtlich der Oxydation von Fettsäuren und unverseifbaren Substanzen im Verlauf des Verfahrens.

Von

Munemichi Tamura.

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 19. Mai 1913.)

Die Fettbestimmungsmethode nach Kumagawa-Suto[1]) scheint gegenwärtig als die zuverlässigste Methode in den medizinischen Kreisen allgemeine Anerkennung gefunden zu haben. Indes läßt sich gegen diese Methode noch ein Einwand erheben. Dieser betrifft nämlich die Oxydation der Fettsäuren im Verlaufe des Verfahrens, weil bei der genannten Methode außer der letzten Trocknung der Fettsäuren resp. unverseifbaren Substanzen im Vakuum sonst wenig Rücksicht auf die Oxydation der letzteren genommen wird.

Bereits vor dem Bekanntwerden dieser Methode hat P. Hartley[2]) darauf aufmerksam gemacht, daß die aus tierischen Geweben isolierten ungesättigten Fettsäuren an der Luft sehr leicht oxydiert werden und ihre Jodzahl abnimmt. Auf Grund dieser Erfahrung hat V. H. Mottram[3]) empfohlen, alle Manipulationen bei der Verseifungsmethode von Kumagawa-Suto streng im Vakuum resp. in CO_2-Atmosphäre auszuführen, indem als Material zur Fettbestimmung nur frische Gewebe resp. Organe verwertet werden. Y. Shimidzu[4]) und der Verfasser[5]) stellten ebenfalls fest, daß der Fettgehalt der feuchten tierischen Gewebe beim Trocknen auf dem Wasserbade infolge der Oxydation mehr oder weniger abnimmt.

---

[1]) M. Kumagawa u. K. Suto, diese Zeitschr. 8, 212, 1908.

[2]) P. Hartley, Journ. of Physiol. 36, 17, 1907; 38, 354, 1909.

[3]) V. H. Mottram, Journ. of Physiol. 38, 281, 1909; 40, 122, 1910.

[4]) Y. Shimidzu, diese Zeitschr. 28, 237, 1910.

[5]) M. Tamura, diese Zeitschr. 41, 78, 1912.

Demnach hat Mottram vollkommen recht, und es läßt sich gegen seinen Vorschlag theoretisch nichts einwenden. Trotzdem kann man diesen Mottramschen Vorschlag aus praktischen Gründen nicht ohne weiteres als unbedingt notwendig annehmen, weil Mottram keine zwingende Beweise dafür angeführt hat, in welchen Phasen der Ausführung und in welchem Grade die Fettsäuren resp. unverseifbaren Substanzen bei der Kumagawa-Sutoschen Verseifungsmethode oxydiert werden. Um so mehr, da die Methode von Kumagawa-Suto, die sich in ihrer ursprünglichen Form sehr leicht und schnell ausführen läßt, durch die neuen Modifikationen von Mottram sehr umständlich und zeitraubend, ja sogar praktisch unausführbar wird. Es war daher dringend erwünscht, zu prüfen, inwiefern die Mottramsche Empfehlung berechtigt ist.

Aus dieser Erwägung heraus habe ich es auf Veranlassung und unter der Leitung von Herrn Prof. M. Kumagawa unternommen, alle einzelnen Phasen der Verseifungsmethode teils im Vakuum, teils in der ursprünglichen Angabe von Kumagawa-Suto einer streng vergleichenden Nachprüfung zu unterziehen.

A. Werden die Fettsäuren aus tierischen Geweben durch Verdampfen ihrer petrolätherischen Lösung bei 50° unter Ventilation im freien Raume (Kumagawa-Sutosches Verfahren) merklich verändert?

Als Material zu diesen Untersuchungen habe ich absichtlich die Leinölfettsäuren benutzt, weil nach Hartley das Organfett außer Ölsäure noch ungesättigtere Fettsäure, wie Linolsäure, und eine Fettsäure der Formel $C_{20}H_{32}O_2$ enthält und sich wie ein trocknendes Öl verhält. Das Leinöl[1]) ist bekanntlich sehr reich an ungesättigten Fettsäuren und hat die hohe Jodzahl von 155 bis 182. Die daraus isolierten Fettsäuren sind viel leichter oxydabel als irgendein tierisches Organfett.

Von dem Leinöl (Oleum lini. ph. jap. III) wurden 20 ccm im Rundkolben von 250 ccm Inhalt unter Rückfluß mit 80 ccm Alkohol (95 %) und 10 ccm Natronlauge (sp. G. = 1,5) 1 Stunde lang gekocht und vollständig verseift. Diese Seifenlösung wurde mit Wasser zu 160 ccm verdünnt, damit der Alkoholgehalt auf etwa 50 % sank, und im Scheidentrichter 3 mal mit je 100 ccm Petroläther geschüttelt, um in Petroläther lösliche Verunreinigungen zu entfernen. Diese Seifenlösung wurde mit Salzsäure angesäuert, und die ausgeschiedenen Leinölfettsäuren wurden mit 100 ccm Petroläther ausgeschüttelt. Die petrolathe-

[1]) Wilheln Fahrion, Die Chemie der trocknenden Öle. S. 72.

rische Lösung wurde in ein hierzu besonders konstruiertes Fläschchen[1]) mit Gasleitungsvorrichtung hineingegossen und bei 50° im gereinigten und getrockneten CO_2-Strom verdunstet und im Vakuumexsiccator über Chlorcalcium aufbewahrt.

Versuchsreihe 1.

Von den gereinigten Leinölfettsäuren wurden je 20 Tropfen in 2 Bechergläser von 100 ccm Inhalt und in 3 Gasleitungsfläschchen hineingeträufelt und bei 50° im Vakuum bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Die Gewichtsänderungen, die die Fettsäuren bei der Trocknung erlitten, sind folgende:

Tabelle I.

Gewicht der Fettsäuren von je 20 Tropfen bei der Trocknung im Vakuum bei 50°.

Nummer der Proben	Gewicht der Fettsäuren		
	nach 3 Stunden g	nach 6 Stunden g	nach 9 Stunden g
1 a	0,4604	0,4604	0,4600
2 a	0,3676	0,3676	0,3676
3 a	0,4230	0,4230	0,4228
4 a	0,4552	0,4550	0,4548
5 a	0,4612	0,4608	0,4608

Die Proben 1a und 5a: in Becherglas.

Die Proben 2a, 3a und 4a: in Gasleitungsfläschchen.

Alle Proben wurden nach 9 Stunden konstant. Die Probe 1a wurde als Kontrolle ohne Auflösung in Petroläther, also ohne Gasbehandlung, direkt auf ihre Jodzahl geprüft. Sie betrug 172,3. Andere 3 Proben (2a, 3a und 4a) wurden in je 40 ccm Petroläther aufgelöst, und die Probe 2a im O_2-Strom, 3a im H_2-Strom und 4a im CO_2-Strom bei 50° verdunstet. Die Zeitdauer der Verdampfung des Petroläthers betrug je ca. $1\frac{1}{2}$ Stunden mit einem Verbrauche von je ca. 7 Liter Gas. Danach wurden alle 3 Proben wiederum im Vakuum bei 50° bis zum konstanten

---

[1]) Eine Art kleiner Erlenmeyerschen Flasche (100 ccm Inhalt) aus dünnwandigem Glas, die gegen den Boden erweitert ist, so daß der Bodendurchmesser ($7\frac{1}{2}$ cm) etwa doppelt so groß ist wie die Höhe (4 cm). Der außen hermetisch abgeschliffene tubusartig erweiterte Stöpsel hat als Fortsetzung des Gasleitungsrohres innerlich ein eingeschmolzenes Glasröhrchen, dessen unteres Ende eine kuglige Erweiterung mit einigen feinen Öffnungen hat und beinahe bis zum Boden reicht. Seitlich aus dem Tubusteil des Stöpsels geht das Abflußrohr für Gase. Dasselbe hat in seinem aufsteigenden Schenkel eine kuglige Erweiterung, die vor der Verschleuderung des Inhaltes schützt. Das Fläschchen wird bei der Beschreibung kurz als Gasleitungsfläschchen bezeichnet.

Gewicht getrocknet. Vollkommene Trocknung wurde nach 9 Stunden erzielt. Hiernach wurde von jeder Probe die Jodzahl bestimmt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet:

Tabelle II.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers mittels des Gasstromes bei 50°.

Nummer der Proben	Art der Gase	Gewicht der Fettsäuren			Jodzahl am Ende
		nach 3 Stunden g	nach 6 Stunden g	nach 9 Stunden g	
2a	O_2	0,3912	0,3690	0,3682	175,8
3a	H_2	0,4260	0,4246	0,4242	172,3
4a	CO_2	0,4598	0,4568	0,4560	171,2

Die Probe 5a wurde in 150 ccm Petroläther aufgelöst und nach Kumagawa-Suto im freien Raume unter Ventilation bei 50° verdunstet und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Darauf wurde ihre Jodzahl bestimmt. Die Resultate lauten wie in der Tabelle III:

Tabelle III.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers im freien Raume unter Ventilation.

Nummer der Proben	Gewicht der Fettsäuren			Jodzahl
	nach 3 Stunden g	nach 6 Stunden g	nach 9 Stunden g	
5a	0,4616	0,4616	0,4616	171,4

Hiernach hat sich gegen die Erwartung herausgestellt, daß sich das Gewicht und die Jodzahl der Fettsäuren bei der Verdunstung des Petroläthers im O_2-Strom resp. an der freien Luft ebensowenig verändert, wie bei der Behandlung im H_2- resp. im CO_2-Strom. Allerdings betrug die Zeitdauer bis zur vollständigen Verdunstung des Lösungsmittels nicht länger als $1\,^1/_2$ Stunden. Zur besseren Übersicht dieses Verhaltens sind die Resultate in der nebenstehenden Tabelle IV zusammengestellt.

Versuchsreihe 2.

Wiederholung der vorhergehenden Versuche.

In der Erwägung, daß sich bei längerer Dauer der Petrolätherverdunstung möglicherweise andere Resultate ergeben könnten, habe ich die Versuche neu angestellt.

Tabelle IV.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers mit verschiedenem Gasstrom.

Nummer der Proben	Art der Behandlung	Gewicht der Fettsäuren vor der Behandlung g	nach der Behandlung g	Jodzahl am Ende
1a	Kontrolle ohne Gasbehandlung	0,4600	—	172,3
2a	Verdunstung im O_2-Strom	0,3676	0,3682	175,8
3a	Verdunstung im H_2-Strom	0,4228	0,4242	172,3
4a	Verdunstung im CO_2-Strom	0,4548	0,4560	171,2
5a	Verdunstung im freien Raume unter Ventilat. nach Kumagawa-Suto	0,4608	0,4616	171,4

Hierzu habe ich von jenen Leinölfettsäuren, die nach der Benutzung für Versuch 1 im Vakuum und im Dunkeln aufbewahrt worden sind, je 20 Tropfen in 2 Bechergläser von je 100 ccm Inhalt und in 3 Gasleitungsfläschchen eingegossen. Diese 5 Proben wurden im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Die Zahlen sind in der Tabelle V zusammengestellt:

Tabelle V.

Gewicht der Fettsäuren bei der Trocknung im Vakuum bei 50°.

Nummer der Proben	Gewicht der Fettsäuren nach 3 Std. g	nach 6 Std. g	nach 9 Std. g	nach 12 Std. g
1b	0,4284	0,4282	0,4282	—
2b	0,4278	0,4272	0,4264	0,4264
3b	0,4386	0,4344	0,4326	0,4320
4b	0,4216	0,4202	0,4204	0,4202
5b	0,3948	0,3946	0,3948	0,3944

Die Proben 1b und 5b im Becherglas. Die Proben 2b, 3b und 4b in Gasleitungsfläschchen.

Dann wurde bei der Probe 1b direkt ihre Jodzahl bestimmt. Dieselbe betrug 193,8.

Die Proben 2b, 3b und 4b wurden in je 100 ccm Petroläther aufgelöst und 2b im O_2-Strom, 3b im H_2-Strom und 4b im CO_2-Strom bei 50° verdunstet. Zur vollständigen Verdunstung waren je 3 ½ Stunden und 14 Liter Gas erforderlich. Hiernach wurden alle Proben im Vakuum bei 50° getrocknet und schließlich ihre Jodzahl bestimmt. Die näheren Daten finden sich in der Tabelle VI verzeichnet:

Tabelle VI.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Behandlung im Gasstrom bei 50°.

Nummer der Proben	Art der Gase	Gewicht der Fettsäuren nach 3 Std. g	nach 6 Std. g	nach 9 Std. g	nach 12 Std. g	Jodzahl am Ende
2 b	O_2	0,4312	0,4274	0,4266	0,4266	172,0
3 b	H_2	0,4344	0,4314	0,4294	0,4278	170,6
4 b	CO_2	0,4244	0,4220	0,4206	0,4204	170,2

Die Probe 5b wurde in 200 ccm Petroläther aufgelöst und nach Kumagawa-Suto im freien Raume unter Ventilation verdunstet. Die Zeitdauer der Verdunstung betrug $1^2/_2$ Stunden. Alsdann wurde sie im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und darauf ihre Jodzahl bestimmt.

Tabelle VII.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers im freien Raume unter Ventilation.

Nummer der Proben	Gewicht der Fettsäuren nach 3 Std. g	nach 6 Std. g	nach 9 Std. g	nach 12 Std. g	Jodzahl am Ende
5 b	0,3948	0,3952	0,3950	0,3948	172,7

Auch bei dieser Versuchsreihe konnte ich zwischen der Behandlung im O_2- resp. Luft-Strom einerseits und der im H_2- resp. CO_2-Strom andererseits weder im Gewicht noch in der Jodzahl der Leinölfettsäuren einen merklichen Unterschied feststellen. Allerdings sind die Zahlen für die Probe 3b nicht ganz korrekt. Hier ist wohl irgendein Fehler hineingeschleppt worden. Die Resultate dieser Versuchsreihe sind in der folgenden Tabelle VIII zusammengestellt.

Nach diesen Untersuchungen hat sich in der Tat wider Erwarten herausgestellt, daß außer Nr. 3b (Bestimmungsfehler ?) die Fettsäuren sowohl an Gewicht wie in ihrer Jodzahl überhaupt keine merkliche Veränderung erlitten haben, mit welchen Gasen man ihr Lösungsmittel (Petroläther) auch ausgetrieben hat. Dieser Befund kann nur so gedeutet werden, daß der Ätherdampf während der Verdunstung die Fettsäuren vollständig vor ihrer Oxydation schützt, indem die Berührung der Gase mit den Fettsäuren durch den Ätherdampf verhindert

Tabelle VIII.

Gewicht und Jodzahl der Fettzäuren nach der Verdunstung des Petroläthers mit verschiedenem Gasstrom.

Nummer der Proben	Art der Behandlung	Gewicht der Fettsäuren vor der Behandlung g	nach der Behandlung g	Jodzahl am Ende
1 b	Kontrolle ohne Gasbehandlung	0,4282	—	173,8
2 b	Verdunstung im O_2-Strom	0,4264	0,4266	172,0
3 b	Verdunstung im H_2-Strom	0,4320	0,4278	170,6
4 b	Verdunstung im CO_2-Strom	0,4202	0,4204	170,2
5 b	Verdunstung im freien Raume unter Ventilat. nach Kumagawa-Suto	0,3944	0,3948	172,7

Die einzelnen Daten aus den Versuchsreihen 1 und 2 sind zur besseren Übersicht in einer Tabelle (IX) zusammengefaßt.

Tabelle IX.

Übersichtstabelle für die näheren Daten aus den Versuchsreihen 1 und 2.

Art der Behandlung	Nummer der Proben	Menge des zugesetzten Petroläthers ccm	Menge der verbrauchten Gase zur Verdunstung l	Zeitdauer der Verdunstung Std.	Gewichtsveränderung der Fettsäuren nach der Gasbehandlung %	Abweichung der Jodzahl von der Kontrollprobe %
Verdunstung im O_2-Strom	2 a	40	7	$1^1/_2$	+0,16	+1,6
	b	100	14	$3^1/_2$	+0,05	−0,2
Verdunstung im H_2-Strom	3 a	40	7	$1^1/_2$	+0,33	± 0
	b	100	14	$3^1/_2$	−0,99	−1,0
Verdunstung im CO_2-Strom	4 a	40	7	$1^1/_2$	+0,26	−0,6
	b	100	14	$3^1/_2$	+0,05	−1,2
Verdunstung im freien Raume unter Ventilat. nach Kumagawa-Suto	5 a	150	—	$1^1/_2$	+0,18	−0,5
	b	200	—	$1^2/_3$	+0,10	+0,2

wird; das ist auch dann der Fall, wenn man den Petroläther im reinem Sauerstoffstrom austreibt. Bisher war man vielfach der Meinung, die ätherische Fettlösung müsse wegen der sonst eintretenden Oxydation der Fettsäuren im CO_2-Strom verdunstet werden, wie es auch Mottram empfiehlt. Diese

Befürchtung ist nunmehr glücklicherweise durch diese Untersuchungen ganz gegenstandslos geworden. Hieraus geht also mit Sicherheit hervor, daß die Verdunstung des Petroläthers im freien Raume nach Art von Kumagawa-Suto ebenfalls keinen Fehler aufweist.

B. Wird die Fettsäure bei der Trocknung im Trockenschrank bei 50° nach der Verdunstung des Petroläthers merklich verändert?

In den oben angeführten Versuchen habe ich die Fettsäuren nach Verdunstung des Petroläthers stets im Vakuum bei 50° getrocknet. Nach der Vorschrift von Kumagawa-Suto werden die Fettsäuren nach Verdunstung des Petroläthers nicht im Vakuum, sondern einfach im Trockenschrank bei 50° 1 bis 2 Stunden getrocknet und nach dem Erkalten im Vakuumexsiccator über Chlorcalcium gewogen. Es fragt sich demnach, ob nicht die Fettsäuren beim Trocknen im lufthaltigen Trockenschrank bei 50° mehr oder minder oxydiert werden. Um dies zu prüfen, wurden 2 Proben von je 20 Tropfen derselben Leinölfettsäuren in Bechergläser von je 100 ccm Inhalt eingefüllt und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Dann wurden 150 ccm (Probe a) resp. 200 ccm Petroläther (Probe b) zugesetzt und die Proben darin aufgelöst. Nachdem der Petroläther nach Kumagawa-Suto durch Ventilation verdunstet war, wurden die beiden Proben einfach im Trockenschrank bei 50° während verschieden langer Zeiten getrocknet und nach dem Erkalten im Vakuumexsiccator über Chlorcalcium gewogen und hiernach die Jodzahl bestimmt.

Tabelle X.

Veränderung des Gewichts und der Jodzahl der Fettsäuren beim Trocknen im Trockenschrank bei 50° (nach der Verdunstung des Petroläthers).

Nummer der Proben	Gewicht d. Fettsäuren (i. Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet) g	Zusatz von Petroläther ccm	Zeitdauer d. Verdunstung durch Ventilation	Gewicht der Fettsäuren nach der Trocknung im Trockenschrank bei 50°			Gewicht d. Fettsäuren (3 Std. im Vakuum bei 50° getrocknet) g	Gewichtszunahme der Fettsäuren nach Beendigung des Trockenprozesses g	Jodzahl am Ende	Jodzahlabnahme im Vergleiche mit Kontrollprobe
				nach 3 Std. g	nach 6 Std. g	nach 9 Std. g				
a	0,4822	150	1h 30′	0,4870	0,4932	0,4986	0,4968	0,0146	134,7	38,4
b	0,4170	200	1h 40′	0,4198	0,4244	0,4312	0,4308	0,0138	144,7	28,4
Prozentische Gewichtszunahme der Fettsäuren und Abnahme der Jodzahl nach der Trocknung		Probe a " b		1,0% 0,7%	2,3% 1,8%	3,4% 3,4%	3,3% 3,3%	3,3% 3,3%	22,2% 16,5%	22,2% 16,5%

Hieraus geht hervor, daß die Fettsäuren beim einfachen Trocknen im Trockenschrank bei 50° infolge der Oxydation mit der Länge der Dauer der Trocknung immer mehr an Gewicht zunehmen. Die durchschnittliche Gewichtszunahme in beiden Proben betrug nach 3 Stunden 0,85%, nach 6 Stunden 2% und nach 9 Stunden 3,4%. Demgegenüber betrug die durchschnittliche Abnahme der Jodzahl nach 9stündiger Trocknung bei 50° 19,4% (139,7 gegen 173). Sehr interessant und lehrreich ist der Befund, daß die Abnahme der Jodzahl der Fettsäuren beim Trocknen im Trockenschrank bei 50° im Vergleich zur Gewichtszunahme der letzteren relativ viel größer ist (19,2% gegenüber 3,4%). Dies beweist zur Genüge, daß die Oxydation wesentlich in den ungesättigten Fettsäuren erfolgt. Hiernach kann die Feststellung der Jodzahl als der beste Maßstab zur Erkennung der Oxydation der Fettsäuren verwertet werden. Nach diesen Versuchen kann kein Zweifel mehr darüber bestehen, daß auch beim Kumagawa-Sutoschen Verfahren die Fettsäuren durch das Trocknen im Trockenschrank bei 50° mehr oder minder oxydiert werden. Der hierdurch bedingte Fehler kann indessen unter keinen Umständen größer als 1% sein, denn Kumagawa-Suto belassen die Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers höchstens ein paar Stunden bei 50° im Trockenschrank, während die Gewichtszunahme der Fettsäuren in den obigen Versuchen nach 3stündigem Verweilen im Trockenschrank bei 50° nur 0,85% beträgt. Trotzdem darf diese geringfügige Gewichtszunahme nicht ohne weiteres als innerhalb der Fehlergrenze liegend ganz vernachlässigt werden, weil die Oxydation nur die ungesättigten Fettsäuren betrifft, und dadurch die Abnahme der Jodzahl in relativ stärkerem Grade beeinflußt werden müßte. Um dieses Verhalten noch genauer kennen zu lernen, sind folgende Versuche angestellt worden.

C. Veränderung des Gewichts und der Jodzahl der Fettsäuren bei verschieden langem Trocknen im Trockenschrank bei 50° nach Verdunstung des Petroläthers.

Genau wie oben wurden die reinen Fettsäuren aus 20 ccm Leinöl von neuem hergestellt.

Dieselben wurden in einem Kolben von ca. 200 ccm Rauminhalt mit Petroläther aufgefüllt. Hiervon wurden 8 Proben von je 20 ccm

aus einer Bürette, die mittels besonderer Vorrichtung vor Verdunstung des Petroläthers schützt, in Bechergläser entleert. 2 Proben davon wurden direkt nach Kumagawa-Suto verdunstet und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und am Ende ihre Jodzahl bestimmt. Die Zahlen sind in Tabelle XI zusammengestellt.

Tabelle XI.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren, die folgenden Untersuchungen als Kontrolle zugrunde gelegt wurden.

Nummer der Proben	Art der Vorbehandlung	Gewicht der Fettsäuren nach dem Trocknen im Vakuum bei 50°		Jodzahl am Ende
		nach 3 Stunden g	nach 9 Stunden g	
1	Petrolätherische Lösung direkt verdunstet und getrocknet	0,3922	0,3924	172,2
2		0,3906	0,3908	170,8
Mittel	—	0,3914	0,3916	171,5

Hiernach wurden die mittleren Werte von 0,3916 g Fettsäuren und 171,5 Jodzahl als Kontrolle den folgenden Untersuchungen zugrunde gelegt. Die weiteren 4 Proben von je 20 ccm jener petrolätherischen Fettsäurelösung, die gleichzeitig mit denen der vorhergehenden Untersuchungen in Bechergläser gefüllt waren, wurden nach dem Verdunsten des Petroläthers durch Ventilation im lufthaltigen Trockenschrank bei 50° in verschieden langen Zeitintervallen getrocknet und nach dem Erkalten im Vakuumexsiccator gewogen. Darauf wurde die Jodzahl ermittelt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle XII.

Veränderung des Gewichts und der Jodzahl der Fettsäuren nach verschieden langem Trocknen im Trockenschrank bei 50° nach der Verdunstung des Petroläthers.

Nummer der Proben	Zeitdauer d. Trocknens im Trockenschr. bei 50° Std.	Gewicht der Fettsäuren nach dem Trocknen im Trockenschr. bei 50° g	Absolute Gewichtszunahme der Fettsäuren nach dem Trocknen g	Gewichtszunahme in Prozenten (mit Tabelle XI verglichen) %	Jodzahl nach d. Trocknen	Absolute Abnahme der Jodzahl	Abnahme der Jodzahl in Prozenten (m. Tabelle XI verglichen) %
3	3	0,3939	0,0023	0,6	170,2	1,3	0,8
4	6	0,3960	0,0044	1,2	164,7	6,8	4,0
5	9	0,4008	0,0092	2,4	149,9	21,6	12,6
6	12	0,4080	0,0164	4,2	128,3	43,2	25,3

Hierdurch ist aufs klarste gezeigt worden, daß sowohl die Gewichtszunahme der Fettsäuren wie die Abnahme der Jodzahl infolge der Oxydation um so ausgeprägter zutage treten, je länger die Fettsäuren im Trockenschrank bei 50° verweilen. Nach 12 Stunden betrug die Gewichtszunahme der Fettsäuren 4,2%, während die Abnahme der Jodzahl nach derselben Zeit 25,3% betrug. Diese Veränderungen der Fettsäuren bleiben indessen innerhalb derjenigen Fehlergrenzen, die praktisch ganz vernachlässigt werden können, denn die Gewichtszunahme der Fettsäuren beträgt nach 3 stündigem Verweilen im lufthaltigen Trockenschrank bei 50° nur 0,6% und die Abnahme der Jodzahl 0,8%. Da nach der Kumagawa-Sutoschen Vorschrift die Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers höchstens 2 Stunden im Trockenschrank bei 50° bleiben, so hat sich durch diese Untersuchung mit Sicherheit ergeben, daß die Verseifungsmethode nach Kumagawa-Suto weder bei der Verdunstung des Petroläthers, noch beim Trocknen der Fettsäuren im Trockenschrank bei 50° praktisch Fehler ergibt. Wenn man aber über eine ganz einfache und praktische Methode der Vakuumtrocknung bei erhöhter Temperatur verfügt, so ist dieselbe natürlich der Trocknung im lufthaltigen Trockenschrank vorzuziehen, weil bei der letzteren in den Fällen Fehler doch unvermeidlich werden, wenn die Fettsäuren aus Versehen längere Zeit im Trockenschrank bleiben.

Ich habe schon einmal darauf aufmerksam gemacht, daß beim Trocknen des Fleischbreies auf dem Wasserbade mit Alkoholzusatz der Alkoholdampf die Fettsäuren mehr oder minder vor der Oxydation schützt. Die gleiche Schutzwirkung kommt nicht nur bei der Verdunstung der petrolätherischen Lösung der Fettsäuren, sondern auch bei der Trocknung der Fettsäuren im Trockenschrank bei 50° zur Geltung. Wie es in der vorstehenden Tabelle verzeichnet ist, sind die Größen der Gewichtszunahme und der Jodzahlabnahme der Fettsäuren beim verschieden langen Trocknen im Trockenschrank bei 50° mit der Dauer der Trocknung nicht proportional, sondern relativ viel bedeutender. Dieser Befund kann durch die Schutzwirkung des den Fettsäuren beigemengten Petroläthers, der im Trockenschrank allmählich verdunstet, leicht erklärt werden.

Übrigens habe ich noch einmal geprüft und festgestellt, daß die Fettsäuren bei der Verdunstung des Petroläthers nach Kumagawa-Suto sich nicht merklich verändern. Dazu habe ich noch zwei andere Proben benutzt. Die beiden Proben wurden nach weiterem Zusatz von 150 ccm Petroläther nach Kumagawa-Suto verdunstet und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet und schließlich ihre Jodzahl bestimmt (siehe Tabelle XIII).

Tabelle XIII.

Veränderung des Gewichts und der Jodzahl der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers unter Ventilation bei 50°.

Nummer der Proben	Menge d. weiter zugesetzten Petroläthers ccm	Zeitdauer d. Verdunstung Std.	Gewicht der Fettsäuren nach dem Trocknen im Vakuum bei 50° nach 3 Stunden g	nach 9 Stunden g	Gewichtsveränderung in Prozenten (m. Tabelle XI verglichen) %	Jodzahl nach dem Trocknen	Abweichung d. Jodzahl in Prozenten (m. Tabelle XI verglichen) %
7	150	1 1/2	0,3924	0,3920	+ 0,1	171,3	− 0,1
8	150	1 1/2	0,3906	0,3908	− 0,2	171,0	− 0,3
Mittel	150	1 1/2	0,3915	0,3914	− 0,05	171,2	− 0,2

Wie aus der Tabelle ersichtlich, ist keine merkliche Gewichtszunahme und Jodzahlabnahme der Fettsäuren bemerkbar.

D. Findet bei der Verseifung der tierischen Gewebe mit Ätzalkali irgendeine Oxydation der Fettsäuren statt?

Obgleich diese Fragestellung nach den bisherigen zahlreichen Erfahrungen von vornherein unnötig erscheint, so empfiehlt neuerdings Mottram, bei der Fettbestimmung nach Kumagawa-Suto die Verseifung des tierischen Materials ebenfalls im Vakuum auszuführen. Daher habe ich zur Entscheidung dieser Frage einige Versuche angestellt.

Von den neu hergestellten reinen Fettsäuren aus dem Leinöl wurden 9 Proben von je 12 Tropfen in ein Becherglas resp. eine Vakuumflasche gebracht, und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewicht getrocknet. Von 2 dieser Proben wurde als Kontrolle direkt die Jodzahl bestimmt (siehe Tabelle XIV).

Tabelle XIV.

Die Jodzahl der Fettsäuren, die den folgenden Untersuchungen als Kontrolle zugrunde gelegt wurden.

Nummer der Proben	Jodzahl der Fettsäuren
1	170,9
2	172,1
Mittel	171,5

Eine Probe (Nr. 3) wurde ebenfalls als Kontrolle einfach auf dem siedenden Wasserbade mit einer Glasglocke bedeckt, $1^1/_2$ Stunden lang erhitzt und dann auf ihre Jodzahl bestimmt. Sie betrug 170,9. 4 Proben wurden mit Ätznatronlösung, darunter 2 mit 25 ccm NaOH-Lösung von 20 g/dl, und andere 2 mit 8 ccm NaOH-Lösung von 60 g/dl, auf dem Wasserbade mit der bedeckten Glocke $1^1/_2$ Stunden lang erhitzt und dann mit 20 ccm 30% HCl angesäuert und die ausgeschiedenen Fettsäuren mit Petroläther unter geringem Alkoholzusatz aufgenommen. Diese petrolätherische Lösung wurde mit ein wenig 50%igem Alkohol geschüttelt und von der Spur beigemengten Salzes befreit. Darauf wurde die petrolätherische Lösung auf dem Wasserbade bei 50° unter Ventilation verdunstet und im Vakuum bei 50° bis zum konstanten Gewichte getrocknet. Alsdann wurde die Jodzahl bestimmt. Die Resultate sind folgende:

Tabelle XV.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verseifung im Wasserbade mit bedeckter Glasglocke.

Nummer der Proben	Menge der Fettsäuren g	Menge und Konzentration der zugesetzten NaOH-Lösung	Menge der wiedergewonnenen Fettsäuren g	Jodzahl nach der Verseifung
4	0,3730	25 ccm von 20 g/dl	0,3724	170,2
5	0,3744		0,3736	169,7
Mittel	0,3737	—	0,3730	170,0
6	0,3704	8 ccm von 60 g/dl	0,3684	169,7
7	0,3922		0,3918	169,5
Mittel	0,3813	—	0,3801	169,6

Die 2 letzten Proben wurden in einer besonderen Vorrichtung im Vakuum verseift, darunter eine Probe mit 25 ccm NaOH-Lösung von 20 g/dl, die andere mit 8 ccm NaOH-Lösung von 60 g/dl. Weiteres Verfahren geschah in gleicher Weise wie oben (siehe Tabelle XVI).

Tabelle XVI.

Gewicht und Jodzahl der Fettsäuren nach der Verseifung im Vakuum.

Nummer der Proben	Menge der Fettsäuren g	Menge und Konzentration der zugesetzten NaOH-Lösung	Menge der wiedergewonnenen Fettsäuren g	Jodzahl nach der Verseifung
8	0,3656	25 ccm von 20 g/dl	0,3644	170,0
9	0,3680	8 ccm von 60 g/dl	0,3678	168,9

Die zusammengefaßten Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Tabelle XVII.

Verlust der Fettsäuren und Abnahme der Jodzahl nach dem Kochen der Fettsäuren mit starker Ätznatronlösung.

Nummer der Proben	Art der Behandlung	Menge und Konzentration der zugesetzten NaOH-Lösung	Verlust der Fettsäuren		Abnahme der Jodzahl	
			g	%	in absoluten Werten	%
3	Ohne Alkalizusatz mit der bedeckten Glocke im Wasserbade gekocht.	—	—	—	0,6	0,4
Mittel von 4 u. 5	Unter Alkalizusatz mit der bedeckten Glocke im Wasserbade gekocht.	25 ccm von 20 g/dl	0,0007	0,2	1,6	0,9
„ „ 6 „ 7		8 „ „ 60 „	0,0012	0,3	1,9	1,0
8	Im Vakuum verseift.	25 „ „ 20 „	0,0012	0,3	1,5	0,9
9	Im Vakuum verseift.	8 „ „ 60 „	0,0002	0,1	2,6	1,5

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, bleibt die Abnahme sowohl der Gewichte wie der Jodzahl der Fettsäuren nach dem Zerkochen mit Ätzkali vollkommen innerhalb der Fehlergrenze. Diese Versuche unterschieden sich allerdings von der Verseifungsmethode von Kumagawa-Suto insofern, daß hier die reinen Fettsäuren mit starkem Alkali zerkocht wurden, während bei Kumagawa-Suto eiweißreiches Gewebe im Wasserbade mit bedeckter Glasglocke mit Alkali zerkocht wird. Dieser Unterschied begünstigt indes beim Kumagawa-Sutoschen Verfahren in keinem Falle die etwaige Möglichkeit der Fettoxydation, weil die Gegenwart von Eiweiß resp. von seinen Zersetzungsprodukten die Fettsäuren vielmehr vor dem Angriff

des Ätzkalis schützen würde. Andrerseits wird beim Kumagawa-Sutoschen Verfahren die Luft im Becherglase teils durch Wasserdampf, teils durch Ammoniakdampf im ganzen Verlaufe bis auf ein Minimum verdrängt. Somit ist durch diese Untersuchungen mit Sicherheit festgestellt worden, daß bei der Verseifung des tierischen Materials mit Ätzkali nach Art von Kumagawa-Suto überhaupt keine Veränderung der Fettsäuren stattfindet.

Mottram empfiehlt, die tierischen Gewebe im Vakuum mit stark konzentrierter Ätzkalilösung zu verseifen. Doch ist es nicht nötig, die Gewebe mit so stark konzentrierter Ätzkalilösung zu verseifen. Wie schon Kumagawa-Suto, Shimidzu und R. Watanabe[1]) berichtet haben, ist es viel praktischer, nicht sehr konzentrierte Ätzalkalilösung bei der Verseifung zu benutzen, weil sonst bei nachfolgender Überneutralisation mit ebenfalls starker Säure leicht Verluste eintreten können.

E. Werden die unverseifbaren Substanzen bei der Verdunstung ihrer petrolätherischen Lösung bei 50° unter Ventilation im freien Raume merklich verändert?

Es ist, wie erwähnt, von mir mit Sicherheit dargetan worden, daß die Fettsäuren aus tierischem Gewebe bei der Verdunstung ihrer petrolätherischen Lösung bei 50° unter Ventilation im freien Raume nicht merklich verändert werden. Jedoch sind die unverseifbaren Substanzen bekanntlich gegen Oxydation viel labiler als die Fettsäuren. Um dieses Verhalten genauer zu prüfen, habe ich im folgenden besondere Versuche ausgeführt.

Darstellung der reinen unverseifbaren Substanzen aus Pferdefleischbrei.

Der frische Pferdefleischbrei wurde nach Kumagawa-Suto verseift, und die durch 30% HCl ausgeschiedenen Fettsäuren wurden mit Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde auf dem Wasserbade bei 50° unter Ventilation verdunstet, dann der Rückstand in absolutem Äther aufgelöst und nochmals auf dem Wasserbade bei 50° unter Ventilation verdunstet. Nachdem der Rückstand 2 Stunden lang im Vakuum bei 50° getrocknet wurde, wurde derselbe mit Petroläther übergossen. Nach etwa 1 Stunde wurde die petrolätherische Lösung durch Asbestfilter abfiltriert. Zu dem Filtrat wurde ein wenig mehr als das Volumen, das für die Neutralisation der petrolätherischen Lösung nötig war, 50% alkoholische $^{n}/_{10}$-KOH-Lösung zugesetzt und geschüttelt.

---

[1]) R. Watanabe, diese Zeitschr. 41, 71, 1912.

Nachdem die beiden Schichten ganz klar getrennt waren, wurde die untere Alkohol-Wasserschicht abgegossen und die petrolätherische Lösung 2 mal mit obiger alkoholischer KOH-Lösung geschüttelt, um darin noch enthaltene Spuren von Fettsäuren zu entfernen. Die so gereinigte Petrolätherlösung wurde durch weiteren Zusatz von Petroläther auf ca. 200 ccm verdünnt, und hiervon wurden je 20 ccm aus einer Bürette, die durch besondere Vorrichtung vor Verdunstung des Petroläthers schützt, entnommen.

Die Proben a und b wurden in besonderen Gasleitungsfläschchen unter Durchleitung von gereinigtem und getrocknetem CO_2-Gas bei 50° verdunstet, dann 2 mal im Vakuum bei 50° 1 Stunde lang getrocknet und jedesmal nach dem Erkalten im Exsiccator über Chlorcalcium gewogen (siehe die Zahlen in der Tabelle XVIII).

Tabelle XVIII.

Gewicht der unverseifbaren Substanzen im Vakuum nach der Verdunstung des Petroläthers im CO_2-Strom getrocknet.

Nummer der Proben	Nach 1 Std. g	Nach 2 Std. g
a	0,0156	0,0156
b	0,0156	0,0156
Mittel	0,0156	0,0156

Andere 5 Proben wurden in Bechergläser gegossen und auf dem Wasserbade bei 50° unter Ventilation verdunstet, dann im Vakuum bei 50° 1 Stunde lang getrocknet und nach dem Erkalten im Exsiccator gewogen.

Tabelle XIX.

Gewicht der unverseifbaren Substanzen im Vakuum nach der Verdunstung des Petroläthers unter Ventilation getrocknet.

Nummer der Proben	Nach 1 Std. g	Nummer der Proben	Nach 1 Std. g
c	0,0154	f	0,0154
d	0,0156	g	0,0156
e	0,0154	Mittel	0,0155

Die Zahlen stimmen mit den Resultaten der Kontrollproben ganz gut überein. Demnach ist es klar, daß die unverseifbaren Substanzen bei der Verdunstung ihrer petrolätherischen Lösung sich nicht merklich verändern, wenn die Menge des Petroläthers nicht zu groß ist.

F. Werden die unverseifbaren Substanzen bei der Trennung nach Kumagawa-Suto merklich verändert?

Die Probe a wurde genau nach der Vorschrift von Kumagawa-Suto zur Trennung der unverseifbaren Substanzen von den Fettsäuren in einer kleinen Menge Alkohol aufgelöst und nach Zusatz von 0,5 ccm alkoholischer $^{n}/_{10}$-NaOH-Lösung auf dem Wasserbade verdunstet. Nachdem der Rückstand im Trockenschrank bei 100° 20 Minuten lang getrocknet wurde, wurden die unverseifbaren Substanzen mit Petroläther extrahiert, derselbe auf dem Wasserbade bei 50° abgedampft und wieder im Trockenschrank bei 100° 20 Minuten lang getrocknet. Alsdann wurde das Gewicht nach dem Erkalten im Exsiccator festgestellt.

Tabelle XX.

Gewichtsänderung der unverseifbaren Substanzen bei der Trennung der Fettsäuren nach Kumagawa-Suto.

Nummer der Probe	Menge der unverseifbaren Substanzen vor der Behandlung	Menge der wiedergewonnenen unverseifbaren Substanzen nach d. Behandlung	Gewichtsverlust	
	g	g	g	%
a	0,0154	0,0124	0,0030	19

Die Probe b wurde ohne besondere Operation einfach auf dem Wasserbade 5 Minuten lang, darauf im Trockenschrank bei 100° 40 Minuten lang erwärmt und nach dem Erkalten im Exsiccator gewogen.

Tabelle XXI.

Gewichtsänderung der unverseifbaren Substanzen nach der Erhitzung auf dem Wasserbade resp. im Trockenschrank.

Nummer der Probe	Menge der unverseifbaren Substanzen vor der Erhitzung	Menge der unverseifbaren Substanzen nach der Erhitzung	Gewichtsverlust	
	g	g	g	%
b	0,0154	0,0132	0,0022	14

Diese beiden Untersuchungen haben uns gezeigt, daß die Gewichtsänderungen der unverseifbaren Substanzen nach dem Verfahren von Kumagawa-Suto nicht vernachlässigt werden dürfen. Obwohl die absoluten Werte der Gewichtsverluste in den beiden Versuchen nicht so groß sind, so erreichen die prozentischen Verluste doch einen ansehnlichen Wert.

Es steht zurzeit noch eine exakte Untersuchung aus, die uns zeigt, wie sich die unverseifbaren Substanzen gegen hohe Temperaturen verhalten. Um diese Lücke auszufüllen, habe ich noch folgende Versuche ausgeführt.

G. Inwiefern werden die unverseifbaren Substanzen bei der Erhitzung im lufthaltigen Trockenschrank bei 50 resp. 100° angegriffen?

Hierzu habe ich die Proben c, d, e und f benutzt. Die Proben c und d wurden im lufthaltigen Trockenschrank bei 50 resp. 100° während verschiedener Zeitdauer erhitzt und jedesmal nach dem Erkalten im Exsiccator gewogen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.

Tabelle XXII.

Gewichtsverlust der unverseifbaren Substanzen bei der Erhitzung im lufthaltigen Trockenschrank bei 50 resp. 100°.

Zeitdauer der Erhitzung	Temperatur d. Erhitzung	Gewicht der unverseifbaren Substanzen			Gewichtsabnahme der unverseifbaren Substanzen	
		Probe c	Probe d	Mittel		
Std.	Grad	g	g	g	g	%
0	0	0,0154	0,0156	0,0155	0	0
1	50	0,0146	0,0148	0,0147	0,0008	5,2
2	50	0,0146	0,0146	0,0146	0,0009	5,8
3	50	0,0144	0,0142	0,0143	0,0012	7,8
10	50	0,0142	0,0136	0,0139	0,0016	10,3
20	50	0,0138	0,0132	0,0135	0,0020	12,9
30	50	0,0134	0,0130	0,0132	0,0023	14,8
60	50	0,0126	0,0120	0,0123	0,0032	20,6
80	50	0,0124	0,0118	0,0121	0,0034	21,9
(mit Petroläther extrahiert)		0,0120	0,0110	0,0115	0,0040	25,9
weiter 20	50	0,0120	0,0108	0,0114	0,0041	26,4
weiter 10	100	0,0104	0,0092	0,0098	0,0057	36,8
weiter 30	100	0,0090	0,0086	0,0088	0,0067	43,2
(mit Petroläther extrahiert)		0,0086	0,0090	0,0078	0,0077	49,7

Die in Klammern bezeichnete Extraktion wurde im Verlaufe der Trocknung eingeschaltet, um zu sehen, ob die unverseifbaren Substanzen beim Trocknen zum Teil in Petroläther unlöslich werden.

Die Gewichtsabnahme betrug bei 50° nach 1 Stunde etwa 5,2% und nach 80 Stunden ca. 21,9%. Alsdann wurden die Proben mit Petroläther extrahiert. Hierbei betrug die Gewichtsabnahme 3,9%. Als die betreffenden Proben weiter 20 Stunden bei 50° getrocknet wurden, trat jetzt keine Gewichtsabnahme mehr ein. Wurden sie dann bei 100° weiter noch 10 Stunden getrocknet, so war die Gewichtsabnahme von neuem 10% und bei weiteren 40 Stunden 6,5%. Nach 140stündiger Erhitzung im ganzen waren die beiden Proben im Mittel etwa auf die Hälfte reduziert worden.

Die Proben e und f wurden im lufthaltigen Trockenschrank bei 100° während verschieden langer Zeit erhitzt. Die Resultate sind folgende.

Tabelle XXIII.

Gewichtsverlust der unverseifbaren Substanzen bei der Erhitzung im lufthaltigen Trockenschrank bei 100°.

Zeitdauer der Erhitzung	Gewicht der unverseifbaren Substanzen			Gewichtsverlust der unverseifbaren Substanzen	
	Probe e	Probe f	Mittel		
Std.	g	g	g	g	%
0	0,0154	0,0154	0,0154	0	0
1	0,0132	0,0136	0,0134	0,0020	13,0
2	0,0122	0,0120	0,0121	0,0033	21,4
3	0,0114	0,0114	0,0114	0,0040	25,9
10	0,0108	0,0104	0,0106	0,0048	31,2
20	0,0106	0,0100	0,0103	0,0051	33,1
30	0,0102	0,0094	0,0098	0,0056	36,4
60	0,0096	0,0092	0,0094	0,0060	39,0
80	0,0094	0,0092	0,0093	0,0061	39,6
(mit Petroläther extrahiert)	0,0026	verloren	—	0,0128	83,1
weiter 20	0,0028	—	—	0,0126	81,4
weiter 30	0,0024	—	—	0,0130	84,4
(mit Petroläther extrahiert)	0,0022	—	—	0,0132	85,6

Bei der Erhitzung auf 100° betrug die Gewichtsabnahme der unverseifbaren Substanzen nach 1 Stunde 13% und nach 80 Stunden 39,6%, also etwa doppelt soviel wie bei den vorhergehenden Proben. Alsdann wurden sie mit Petroläther extrahiert. Dabei fand man wiederum eine starke Gewichtsabnahme, die 43,5% betrug. Bei weiterer Erhitzung trat nunmehr keine merkliche Veränderung auf, selbst nicht bei der nachfolgenden Extraktion mit Petroläther.

Die Farbe der unverseifbaren Substanzen veränderte sich bei 50° nicht, wohl aber bei 100°; sie wurde rasch bräunlich. Die Krystallform wurde bei 50° allmählich, bei 100° viel rascher undeutlich.

Hieraus geht ganz unzweifelhaft hervor, daß die unverseifbaren Substanzen gegen hohe Temperaturen sehr empfindlich sind, indem sie teils flüchtig, teils petrolätherunlöslich werden. Je länger man dieselben erhitzt, desto mehr nimmt das Gewicht ab, allerdings mit sinkender Geschwindigkeit.

Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen.

1. Bei der Verseifung tierischen Materials im siedenden Wasserbade mit bedeckender Glasglocke tritt keine Veränderung des Gewichtes und der Jodzahl der Fettsäuren auf.

2. Es hat sich wider Erwarten herausgestellt, daß die Fettsäuren weder an Gewicht noch in ihrer Jodzahl merkliche Veränderungen erleiden, mit welchen Gasen (Sauerstoff-, Luft-, Wasserstoff- resp. Kohlensäure-Strom) man ihr Lösungsmittel (Petroläther) auch austreibt. Der Grund dieses Befundes kann nur darin liegen, daß der Ätherdampf während der Verdunstung die Fettsäuren vollständig vor Oxydation schützt. Bisher war man vielfach der Meinung, die ätherische Lösung müsse wegen der sonst eintretenden Oxydation der Fettsäuren im CO_2-Strom verdunstet werden. Diese Befürchtung ist nunmehr ganz gegenstandslos geworden. Hieraus geht also mit Sicherheit hervor, daß die Verdunstung des Petroläthers im freien Raume nach Art von Kumagawa-Suto ebenfalls keinen Fehler bedingt.

2. Bei der Trocknung im lufthaltigen Trockenschrank bei 50° nach der Verdunstung des Petroläthers werden die Fettsäuren dagegen mehr oder minder angegriffen, indem das Gewicht zu- und die Jodzahl abnimmt. Daher ist es theoretisch richtig, die Trocknung der Fettsäuren nach der Verdunstung des Petroläthers im Vakuum auszuführen. Wenn man aber die Dauer der Trocknung auf nicht länger als 1 bis 2 Stunden bemißt, wie bei der Vorschrift von Kumagawa-Suto, so reduzieren sich die Fehler auf ein solches Minimum, daß dieselben praktisch ganz vernachlässigt werden dürfen.

4. Was die unverseifbaren Substanzen anlangt, so erleiden dieselben bei der Verdunstung des Lösungsmittels im freien Raume bei 50° unter Ventilation ebenfalls keine Gewichtsänderung. Dagegen sind dieselben im trocknen Zustande gegen höhere Temperatur recht empfindlich. Das Gewicht nimmt dabei rasch ab.

5. Nach diesen Untersuchungen ist die Befolgung des Vorschlages von Mottram, bei der Verseifungsmethode nach Kumagawa-Suto alle Operationen unter Luftabschluß auszuführen, nicht nötig. Die Befürchtungen können praktisch ganz vernachlässigt werden, weil weder bei der Verseifung des tierischen Materials, noch bei der Verdunstung des Petroläthers, noch bei der kurzen Trocknung bei 50° im freien Raume eine merkliche Oxydation der Fettsäuren stattfindet. Allerdings sind die unverseifbaren Substanzen beim Trocknen im freien Raume sehr leicht oxydabel und werden bei der Abtrennung

derselben nach Kumagawa-Suto ebenfalls mehr oder minder oxydiert. Wenn daher für Kumagawa-Sutos Verfahren nur noch eine einwandfreie Trennung der unverseifbaren Substanzen ausgearbeitet wird, so hat diese Verseifungsmethode nach wie vor als die beste und genaueste Fettbestimmungsmethode ihre volle Geltung.

Mit der Ausarbeitung einer einwandfreien Trennung der Fettsäuren von den unverseifbaren Substanzen bin ich gegenwärtig beschäftigt. Die Resultate dieser Untersuchungen werden demnächst zur Publikation gelangen.

Weitere Untersuchungen über die biochemische Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure nebst Bemerkungen über die Entstehung der verschiedenen Milchsäuren in der Natur.

Von

Carl Neuberg.

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der kgl. Landwirschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

Tierische Organe besitzen die Fähigkeit, nicht nur Brenztraubensäure, $CH_3.CO.COOH$, zu zerstören, sondern auch den zu dieser Säure gehörigen Aldehyd, das Methylglyoxal, $CH_3.CO.COH$ bez. $CH_2:C(OH).COH$, mit bemerkenswerter Leichtigkeit umzuwandeln[1]).

Nach den früheren Feststellungen[1]) verschwindet Methylglyoxal bei Digestion seiner $^1/_2\,^0/_0$igen Lösungen mit Muskel- oder Lebergewebe in 24 Stunden so vollständig, daß kaum unverändertes Ausgangsmaterial mehr nachgewiesen werden kann. Als Produkt dieser Umwandlung werden erhebliche Mengen Milchsäure gebildet. Gekochte Organe bewirken in derselben Zeit keine entsprechende Veränderung des zugesetzten Methylglyoxals, so daß der Vorgang damit als ein fermentativer gekennzeichnet ist.

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms sind Versuche angestellt worden, dasselbe von den Zellen zu trennen. Die große Analogie des Fermentes mit den Aldehydasen (s. S. 486) wies dazu den Weg. Es ergab sich bald, daß wässerige Gewebsauszüge imstande sind, Methylglyoxal anzugreifen; allein die Umwandlung erreicht sehr bald ein Ende, noch lange bevor sämtliches Methylglyoxal umgesetzt ist.

---

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 49, 502, 1913.

Während es also zunächst schien, daß das auf Methylglyoxal wirkende Ferment nur unvollkommen von den Zellen abtrennbar sei, ergab die genauere Untersuchung, daß auch mit Gewebsauszügen eine weitgehende Umwandlung von Methylglyoxal zu erzielen ist, wenn die Reaktion des Milieus entsprechend reguliert wird. Schon in der 1. Mitteilung habe ich darauf hingewiesen, daß eine schwache Erhöhung der Hydroxylionenkonzentration, Zusätze von Natriumbicarbonat oder von Phosphaten, die Milchsäurebildung begünstigen. Diese Zusätze dienen offenbar zur Neutralisation der entstehenden Milchsäure. Bei den Versuchen mit zerkleinerten Organen sind solche Beigaben nicht unbedingt erforderlich, da die vorhandenen Zellproteine an sich Milchsäure binden. Arbeitet man dagegen mit Organauszügen, so fallen die natürlichen Regulatoren fort, und es bedarf besonderer Zusätze. Wie früher wandte ich zunächst Natriumbicarbonat und Dinatriumphosphat an, und es ergab sich nunmehr, daß in den so behandelten Gewebsauszügen Methylglyoxal beim Stehen im Brutschrank weitgehend verschwindet. Zur Gewinnung der Organauszüge wurden, analog den früher gewählten Mengenverhältnissen, die fein zerkleinerten Gewebe (Muskel, Leber) mit der 10 fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung[1]) unter Umschütteln $^1/_2$ Stunde bei 37^0 digeriert und dann durch Filtrierpapier filtriert. Die so erhaltenen Auszüge können direkt als Fermentlösungen benutzt werden. Durch völlige Klärung auf der Zentrifuge ändert sich die Wirksamkeit nicht merklich; Behandlung mit kolloidalem Eisenhydroxyd hat eine wesentliche Schwächung oder völlige Aufhebung zur Folge. Erhitzt man die Gewebsauszüge zum Sieden, so zeigen sie keinerlei Wirkung mehr auf Methylglyoxal, dagegen verträgt das Ferment ähnlich wie die Carboxylase[2]) 10 Minuten langes Erwärmen auf 51^0, und zwar haftet die Wirkung nicht an den ausgeschiedenen Flocken, sondern ist im Filtrat von diesen nachweisbar. Längeres Erwärmen auf 51^0 zerstört dieses Ferment jedoch sehr viel schneller als die Carboxylase.

---

[1]) Die Verwendung von NaCl-Lösung ist nicht unbedingt nötig; es kann auch destilliertes Wasser benutzt werden.

[2]) C. Neuberg und P. Rosenthal, diese Zeitschr. 51, 128, 1913.

Wie ich an anderer Stelle ausgeführt habe[1]), ist die biologische Hydratation des Methylglyoxals nichts als eine „innere Cannizzarosche Reaktion". Im allgemeinen betrifft diese die Aldehydreste zweier (gleicher oder auch verschiedener) Aldehyde; die besondere Konstitution des Methylglyoxals, das direkt zwei reaktionsfähige Carbonylgruppen enthält, ermöglicht den intramolekularen Eintritt der Cannizzaroschen Umlagerung:

$$\begin{array}{l} CH_3.CO \\ | \\ COH \end{array} + \begin{array}{c} H_2 \\ | \\ O \end{array} = \begin{array}{l} CH_3.CHOH \\ | \\ COOH \end{array}.$$

Battelli und Stern[2]) sowie Parnas[3]) haben nun vor Jahren die wichtige Beobachtung gemacht, daß tierische Gewebe die Cannizzarosche Reaktion in ausgesprochener Weise beschleunigen. Auf Vorschlag von F. Hofmeister hat Parnas[4]) das Ferment, das diese Umlagerung katalysiert, Aldehydmutase genannt. Das nahe verwandte oder möglicherweise identische Enzym, das Methylglyoxal in Milchsäure überführt, ist dementsprechend vorläufig als Ketonaldehydmutase[5]) zu bezeichnen. Wenn über die Stellung des Ferments mehr Klarheit geschaffen sein wird, dürfte es vielleicht möglich sein, es einfach den Aldehydasen anzureihen, deren Wirkung jedenfalls zum Teil nach Battelli und Stern in einer Katalysierung der Cannizzaroschen Reaktion besteht. Die Methode der Gewinnung, die Wirkungsweise, die optimale Reaktion des Milieus sind für die Ketonalaldehydmutase und die Aldehydase fast identisch. Das Ferment läßt sich nach der Vorschrift von M. Jacoby[6]) mit Ammonsulfat aussalzen, mit Uranylacetat reinigen und ist gegen Toluol wenig empfindlich. Es geht, wie die Aldehydase von

---

[1]) C. Neuberg in Oppenheimers Handb. der Biochemie, Ergänzungsband **1913**, S. 582, 592 u. 593.

[2]) F. Battelli und L. Stern, diese Zeitschr. **28**, 147, 1910; **29**, 130, 1910.

[3]) J. Parnas, diese Zeitschr. **28**, 274, 1910.

[4]) l. c. S. 284.

[5]) Versuche mit der einfachsten Dicarbonylverbindung, dem Glyoxal COH.COH, haben bisher nicht zu sicheren Mengen Glykolsäure geführt. Diese Umwandlung, welche der Milchsäurebildung aus Methylglyoxal ganz analog wäre, konnte auch mit Hefen (s. S. 490) nicht erzielt werden.

[6]) M. Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 135, 1900.

Jacoby und die Mutase von Parnas, in wässerige Lösung über[1]).

In den Gewebsauszügen wirkt die Ketonaldehydmutase, wie erwähnt, am besten, wenn dauernd für neutrale oder ganz schwach alkalische Reaktion Fürsorge[2]) getroffen ist. Nun verursachen die alkalisch reagierenden Salze auch an sich eine geringfügige Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure. Dieselbe läßt sich vermindern, wenn an Stelle der Alkalisalze geeignete Erdalkaliverbindungen gewählt werden. Besonders bewährt hat sich die Verwendung von Calcium als Bicarbonat[3]), und die Einführung dieses Mittels hat es zugleich ermöglicht, eine außerordentlich bequeme und schnell ausführbare Bestimmung der Milchsäure für die vorliegenden Zwecke ausfindig zu machen.

Das Verfahren gestaltet sich dann folgendermaßen:

Je 200 ccm der wie angegeben bereiteten Leber- oder Muskelauszüge werden bei Zimmertemperatur schnell mit Kohlensäuregas gesättigt. Dabei werden in kleinen Anteilen 140 $^0/_0$ derjenigen Menge von kohlensaurem Kalk zugesetzt, die der später zugefügten Menge Methylglyoxal bzw. der daraus hervorgehenden Quantität Milchsäure äquivalent sind, d. h. 1,40 g $CaCO_3$ für 0,72 g $CH_3.CO.COH$, also rund die doppelte Gewichtsmenge.

In die so vorbehandelte Mischung, in der übrigens keineswegs aller kohlensaurer Kalk gelöst ist, trägt man alsdann das Methylglyoxal ein und stellt die einzelnen Proben nach Zugabe eines Tropfens Toluol oder Senföl in den Brutschrank.

Zur Unterbrechung des Versuchs, z. B. nach 24 Stunden, wird die Mischung schnell aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ein Volumen von 250 ccm gebracht. Man erhält leicht ein

---

[1]) Inzwischen ist eine Mitteilung von H. D. Dakin und H. W. Dudley (Journ. of Biol. Chem. 14, 155, 1913) erschienen, in der über die Umwandlung von Phenylglyoxal durch tierische Gewebe in Mandelsäure berichtet ist. In einer Nachschrift führen die Autoren an, daß auch Organauszüge diese Umwandlung zuwege bringen und aus Methylglyoxal Milchsäure erzeugen.

[2]) Schon M. Jacoby (l. c.) hat erkannt, daß leichte Alkalinität für die Wirkung der gewöhnlichen Aldehydase am günstigsten ist.

[3]) Die Bicarbonatalkalinität hat bereits Parnas (l. c.), der $NaHCO_3$ benutzte, als vorteilhaft erkannt.

klares oder nahezu klares Filtrat. 200 ccm desselben, in der also 80 % der Reaktionsprodukte vorhanden sind, werden dann in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade bis auf 10 ccm eingeengt. Dabei erfolgt von neuem Trübung und darauf Bildung eines Niederschlages. Die Abscheidung desselhen vervollständigt man durch Zugabe von 200 ccm siedenden 98 %igen Alkohols und durch kräftiges Umrühren mit dem Glasstab. Nach Abkühlung auf Zimmertemperatur filtriert man durch ein Filter von grobem Filtrierpapier und wäscht den Niederschlag gründlich mit 100 ccm angewärmten Alkohol von 98 % aus. Das alkoholische Filtrat wird abermals auf dem Wasserbad auf etwa 6 ccm eingeengt und von neuem mit 200 ccm heissem Alkohol von 98 % gefällt. Nach dem Filtrieren, Auswaschen und Einengen wird diese Behandlung so oft wiederholt, als noch eine Trübung durch Alkoholzusatz auftritt. In der Regel genügen vier derartige Fällungen. Es gelingt dadurch, nicht nur in Lösung befindliches Calciumbicarbonat völlig zu entfernen, sondern auch alle anderen anorganischen Kalksalze abzuscheiden, ja selbst den größten Teil des aus der physiologischen Kochsalzlösung stammenden Chlornatriums zu beseitigen. In Lösung dagegen befindet sich vollständig, ohne Verlust, aller gebildeter milchsaurer Kalk. Kontrollversuche haben gezeigt, daß 2 g Calciumlactat, gelöst in 6 ccm heißem Wasser, auf Zugabe von 200 ccm 98 %igem Alkohol dauernd in Lösung bleiben, und zwar gilt das für das racemische Salz wie für d-Lactat.

Der schließlich verbleibende Rückstand muß in Alkohol wie Wasser klar löslich sein. Die wässerige Lösung kann direkt, besser nach Überführung in das Zinksalz, zur Polarisation verwendet werden. Für den letzten Zweck ist es erforderlich, Bräunung zu vermeiden. Das bietet bei Muskelextrakten keine besondere Schwierigkeit, wenn man nur dafür sorgt, daß beim Einengen keine Überhitzungen am Rande der Schale stattfinden und das Volumen nicht unter 6 ccm herabgeht. Bei den Leberauszügen erfolgt leicht Dunkelfärbung; man vermindert sie, indem man die Einengungen bei 40° vor sich gehen läßt.

Zur Bestimmung des Calciums füllt man die resultierende Lösung auf 100 ccm auf und bestimmt in einem aliquoten

Teil das Calcium nach der bequemen Methode von Hans Aron[1]).

Es hat sich gezeigt, daß eine Zerstörung der organischen Substanz unnötig ist. Die Fällung des Calciums kann direkt erfolgen.

Aus mehrfachen Gründen ist es selbstverständlich erforderlich, folgende Kontrollproben vorzunehmen:

Einmal wird die gleiche Menge Gewebsextrakt mit Zusatz von Calciumbicarbonat ohne Methylglyoxal dieselbe Zeit im Brutschrank digeriert. Ferner wird die entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung mit Calciumbicarbonat und Kohlensäure behandelt und nach Beschickung mit Methylglyoxal ebenfalls im Brutschrank belassen. Diese Kontrollen sind notwendig, da eine gewisse Menge Milchsäure in den Organextrakten an sich entsteht. Andererseits reagiert Methylglyoxal, wie schon Meisenheimer[2]) angibt, für sich leicht ein wenig sauer und liefert bei Behandlung mit kohlensaurem Kalk eine kleine Quantität Säure, deren Kalksalz in Alkohol löslich ist. Arbeitet man mit dem gleichen Präparat unter gleichen Bedingungen, so ist die aus Methylglyoxal allein hervorgehende Menge Kalksalz recht konstant und beträgt im Durchschnitt 0,083 g wasserfreies Calciumsulfat auf 0,72 g Methylglyoxal. Durch Subtraktion der in den Kontrollen gefundenen Kalksalzmengen von dem Quantum des Hauptversuchs und Multiplikation mit $^5/_4$ findet man die Quantität Milchsäure, die enzymatisch aus Methylglyoxal hervorgegangen ist. 68 g wasserfreies $CaSO_4$ entsprechen 90 g Milchsäure; theoretisch können 72 g Methylglyoxal 90 g Milchsäure ergeben.

Erwähnt sei noch, daß es in einem Falle gelungen ist, durch Abdampfen des resultierenden Alkoholextraktes, Lösen des Rückstandes in wenig heißem Wasser und Aufbewahren im Eisschrank Calciumlactat direkt krystallisiert zu erhalten, und zwar in den typischen knolligen Gebilden.

Das geschilderte Verfahren ist außerordentlich leicht ausführbar, und wenn es auch kaum Anspruch auf absolute Genauigkeit erheben darf, so ist es doch für den gedachten Zweck vollkommen ausreichend und jedenfalls allen Extraktionsmethoden an Bequemlichkeit weit überlegen.

---

[1]) H. Aron, diese Zeitschr. 4, 268, 1907.

[2]) J. Meisenheimer, Ber. 45, 2635, 1912.

Übrigens findet man reine d,l-Milchsäure, die dem mit CO_2 gesättigten Gemisch von NaCl-Organextrakt und Calciumcarbonat zugesetzt ist, zu 92 bis 104,2 %, also etwa zu 100 % wieder[1]).

Die erwähnte Kontrolle mit Gewebssaft für sich ist natürlich auch für die optische Bestimmung nötig. Aus 200 ccm der benutzten Muskelauszüge wurde ein Rückstand erhalten, dessen Lösung in 10,0 ccm Wasser im 2-dcm-Rohr nur schwach links drehte. Das Produkt aus Leberextrakt war etwas stärker lävogyr.

Mit diesem Verfahren ist nun die fermentative Umlagerung des Methylglyoxals durch Gewebssäfte quantitativ verfolgt worden. Mit Muskelextrakten konnte eine enzymatische Bildung bis 74,5 %, durch Leberauszüge bis 76,1 % der möglichen Menge erzielt werden. Eine quantitative Umlagerung ist niemals beobachtet worden, selbst in den Fällen nicht, wo das Methylglyoxal nach der Probe mit p-Nitrophenylhydrazinacetat vollständig verschwunden war. Die Prüfung auf unverändertes Methylglyoxal erfolgte stets in jenem Rest von 50 ccm, der nach Entnahme der 200 ccm für die quantitative Kalkbestimmung hinterblieb.

Das gleiche Verfahren konnte zur Untersuchung von Hefen und Hefenpräparaten auf einen Gehalt von Ketonaldehydmutase benutzt werden. Die Gewinnung von klaren Lösungen für die Polarisation bietet hier gar keine Schwierigkeiten, auch nicht bei Hefemacerationssaft. In letzterem Falle ist es jedoch erforderlich, das reichliche Eiweißkoagulum zweimal mit siedendem Wasser auszukochen, um keine Verluste an Calciumlactat zu erleiden. Weiter ist es nötig, die beschriebene Alkoholfällung hier 5 bis 6 mal vorzunehmen, da in dem Macerationssaft viele Hefebestandteile gelöst sind.

Da die Versuche mit wässerigen Extrakten frischer Hefen im Gegensatz zu den Erfahrungen mit den Auszügen tierischer Organe völlig ergebnislos verliefen, so wurden Ex-

[1]) Die feste Bindung von Milchsäure an die Eiweißkörper, die J. Mondschein (diese Zeitschr. 42, 105, 1912) in v. Fürths Laboratorium in einer interessanten Arbeit nachgewiesen hat, wird offenbar durch das vorhandene Calciumbicarbonat weitgehend verhindert.

perimente mit den lebenden Hefen selbst angestellt, wobei natürlich an Stelle von physiologischer Kochsalzlösung einfach Leitungswasser benutzt wurde. Nur mit einer einzigen obergärigen Hefe (Hefe B des Instituts für Gärungsgewerbe) konnte eine mäßige Umwandlung des Methylglyoxals in Milchsäure beobachtet werden[1]).

Mit Lebedewschem Macerationssaft aus Unterhefe konnte gleichfalls keine sichere Wirkung auf Methylglyoxal nachgewiesen werden. Dagegen ließ ein Macerationssaft aus obergäriger Hefe 12 unzweifelhaft einen nicht unbeträchtlichen Gehalt an Ketonaldehydmutase erkennen. Dieses Verhalten ist insofern interessant, als bekanntlich bei der Gärung durch frische Reinzuchthefen keine Milchsäure auftritt, während sie bei der zellfreien Gärung des Zuckers von Buchner und Meisenheimer[2]) gefunden worden ist. Genau wie dort war die aus Methylglyoxal gebildete Milchsäure optisch inaktiv (s. S. 508).

Die Drehungsverhältnisse der in den Organsaftversuchen gebildeten Milchsäure und die sich daraus ergebenden Konsequenzen bedürfen noch einer besonderen Besprechung.

Schon früher[3]) ist die Milchsäure, die bei der Einwirkung gehackter Organe auf Methylglyoxal als Zinksalz isoliert wurde, optisch aktiv befunden worden. Es handelte sich um ein Gemisch von inaktivem und rechtsdrehenden Salz.

Mit den Gewebsextrakten sind ganz analoge Ergebnisse erzielt worden, indem l-Milchsäure sowie die Racemform beobachtet wurden. Es läßt sich bisher nicht mit Sicherheit angeben, von welchen Bedingungen die Entstehung einer bestimmten Raumform abhängt. Bei den Hefen wurde stets die inaktive Modifikation erzeugt.

Ähnliche Beobachtungen über die Bildung der „unnatürlichen Milchsäure“ haben nun Embden, Baldes und

---

[1]) Angesichts der Analogie zwischen Ketonaldehydmutase und Aldehydase sei hervorgehoben, daß Hefen auch gewöhnlichen Aldehyden gegenüber keine besondere Neigung zur Verwirklichung der Cannizzaroschen Reaktion erkennen lassen.

[2]) E. Buchner und J. Meisenheimer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 630, 1905; 43, 1773, 1910.

[3]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 49, 506, 1913.

Schmitz[1]) bei der Umwandlung von inaktivem Glycerinaldehyd in Milchsäure und Dakin und Dudley (l. c.) bei dem Übergange von Phenylglyoxal in Mandelsäure gemacht. Embden, Baldes und Schmitz fanden bei ihren interessanten Untersuchungen, daß d,l-Glycerinaldehyd bei der Durchleitung in Blut durch die glykogenarme Leber sowie bei der Einwirkung der Formelemente des Blutes allein in ein Gemisch von racemischer und überwiegend lävogyrer Milchsäure übergeführt wird. Dieser Befund ist um so bemerkenswerter, als nach allgemeiner Erfahrung d-Milchsäure als die natürliche Form der Säure zu betrachten ist und z. B. auch aus dem so nahestehenden, strukturell inaktivem Glycerin bei der Leberdurchblutung gebildet wird[2]).

Dakin und Dudley fanden bei der Verfütterung von Phenylglyoxal an Kaninchen im Harn ein Gemenge von inaktiver und vorwiegend l-Mandelsäure. Eine ebensolche Mischung entstand bei der Digestion von Phenylglyoxal mit Organen.

Die erwähnten früheren Beobachtungen lassen sich nun — soweit aus den Literaturangaben ersichtlich ist — unter dem Gesichtspunkte betrachten, der sich für die biologische Aktivierung von Racemkörpern aus zahlreichen Erfahrungen ergibt: „Es wird fast ausnahmslos, wenn überhaupt eine Aktivierung stattfindet, der körperfremde Antipode vorwiegend gebildet. Dessen Menge erreicht maximal die Hälfte des als Ausgangsmaterial benutzten Racemkörpers."

Für gewöhnlich macht man die Annahme, daß die natürliche Komponente irgendwie von dem betreffenden Organismus bzw. Enzym verbraucht oder weiter verarbeitet wird.

In dieser Weise verhalten sich Kohlenhydrate und Aminosäuren im tierischen Organismus, gegen Hefe und gegenüber Fermenten.

Dieser Regel, die aus dem absoluten Mengenverhältnisse abgeleitet ist, fügen sich aber nicht mehr einige Ergebnisse mit Methylglyoxal. Hier ist in eindeutiger Weise weit mehr

[1]) G. Embden, K. Baldes und E. Schmitz, diese Zeitschr. 45, 123, 1912.

[2]) S. Oppenheimer, diese Zeitschr. 45, 42, 1912.

als 50 % des angewandten Methylglyoxals in Form von l-Milchsäure entstanden. Da nun l-Milchsäure in tierischen Zellen von Natur aus nicht vorkommt, so darf man mit Sicherheit einen asymmetrischen Umbau des Methylglyoxals folgern.

Die Deutung eines solchen Vorgangs bietet nun nicht die geringsten Schwierigkeiten, wenn man sich die Prinzipien der in vitro gelungenen asymmetrischen Synthesen (E. Fischer, W. Marckwald, A. Mc Kenzie, L. Rosenthaler, G. Bredig) im biologischen Substrat verwirklicht denkt.

Gerade eine Verbindung wie das Methylglyoxal ist durch besondere Reaktionsfähigkeit ausgezeichnet. Zahlreiche Substanzen können damit unter Bildung eines Alkoholats, Acetals oder eines Aldehyd- bzw. Ketonammoniakderivats usw. reagieren. Diese Substanzen, die den Typen:

$$CH_3.C\begin{smallmatrix}OR\\OH\end{smallmatrix}.CHO,\quad CH_3.CO.CH\begin{smallmatrix}OR\\OH\end{smallmatrix},\quad CH_3.C\begin{smallmatrix}OR\\OH\end{smallmatrix}.CH\begin{smallmatrix}OR\\OH\end{smallmatrix},$$

$$CH_3.C\begin{smallmatrix}OH\\NHR\end{smallmatrix}.CHO,\quad CH_3.CO.CH\begin{smallmatrix}OH\\NHR\end{smallmatrix},\quad CH_3.C\begin{smallmatrix}OH\\NHR\end{smallmatrix}.CH\begin{smallmatrix}OH\\NHR\end{smallmatrix}\quad \text{usw.}$$

angehören, enthalten 1 oder 2 asymmetrische Kohlenstoffatome. Solche Reaktionen können mit den zur Verfügung stehenden optisch-aktiven Zellbestandteilen (mit Zuckern, Aminosäuren, Proteinen) leicht zustande kommen, und es bedarf nicht der Erörterung, wie sie den Umbau des Methylglyoxals zu einer aktiven Form der Milchsäure ermöglichen.

Die Auffindung von l- und d, l-Milchsäure bei der enzymatischen Umwandlung von Methylglyoxal liefert nun einen neuen Beitrag zur Entstehungsgeschichte der Milchsäuremodifikationen in der Natur. Die mitgeteilten Beobachtungen verstärken die Bedenken, die gegen die Darlegungen Embdens[1]) von der Bildung der verschiedenen Milchsäuren in biologischen Substraten gehegt werden müssen.

Embden und seine Mitarbeiter lehren: Ganz allgemein ist Dioxyaceton die Muttersubstanz der racemischen Milchsäure in

---

[1]) Embden, Baldes und Schmitz, l. c.; Embden und Oppenheimer, l. c. S. 206.

der Natur, aktiver Glycerinaldehyd der Erzeuger von entsprechender aktiver Milchsäure.

Dioxyaceton soll im Sinne des Schemas

$$\begin{array}{lcl} CH_2OH & & CH_3 \\ | & & | \\ CO & \nearrow & CHOH \\ \uparrow\downarrow & & | \\ CH_2OH & & COOH \end{array}$$

d,l-Milchsäure liefern, d. h. zwei Wasserstoffe der einen primären Alkoholgruppe sollen die mittelständige Ketogruppe reduzieren und ein Sauerstoffatom der anderen primären Alkoholgruppe an die erstere wandern.

Durch chemische Erfahrungen ist diese Formulierung nicht gestützt. Jedenfalls zeigen unsere Versuche, daß d, l-Milchsäure durch natürliche Prozesse auch aus Methylglyoxal hervorgehen kann.

Im Einklang mit experimentellen Ergebnissen würde etwa die folgende Formulierung stehen:

$$\begin{array}{llllllllll} CH_2OH & & CH_2OH & OH & & CHOH & & CHO & & CHO\quad O \quad & COOH \\ | & & | & -\,| & & \| & & | & & |\quad\;\; | & | \\ CO & +H_2O & C(OH)_2 & \;\;H & \rightarrow & C\!\!>\!O & \rightarrow & COH & \rightarrow & CO\quad HH & CHOH \\ | & \rightarrow & | & & & | & & \| & & | \quad\;\; \rightarrow & | \\ CH_2OH, & & CH_2OH & -\;H_2O & & CH_2 & & CH_2 & & CH_3 & CH_3. \end{array}$$

Die aktive Milchsäure soll dagegen aus aktivem Glycerinaldehyd:

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ |\qquad\quad \rceil \\ CH.OH \;\; | \\ |\qquad\quad\; | \\ COH \leftarrow\!\rfloor \end{array}$$

hervorgehen, derart, daß ohne Änderung am mittleren asymmetrischen C-Atom der Sauerstoff der primären Alkoholgruppe auf die Aldehydgruppe überspringt.

Embden macht diese Überlegungen zugleich zum Ausgangspunkt weitgehender Spekulationen über den Abbau des Traubenzuckers im tierischen Organismus.

Die Kardinalpunkte der Embdenschen Darlegungen gipfeln in den Annahmen, daß durch Aldoldepolymerisation von d-Glucose optisch-aktiver Glycerinaldehyd entsteht, daß dieser dann direkt in d-Milchsäure über-

gehe und umgekehrt sich diese unmittelbar wieder in die Triose umlagere:

$$\begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CHO \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH. \end{array}$$

Wie an anderer Stelle[1]) ausführlich dargelegt ist, sind diese drei Hauptannahmen weder im Tierversuch noch im chemischen Experiment bewiesen. Und selbst wenn der Organversuch den Übergang eines aktiven Glycerinaldehyds in eine bestimmte drehende Form der Milchsäure ergeben sollte, so wäre immer noch wahrscheinlicher als das Embdensche Schema die Annahme eines richtenden Einflusses, den das aktive Ausgangsmaterial auf die Konfiguration des aus einem symmetrischen Zwischenprodukt entstehenden wieder aktiven Stoffes ausübt. (Induktion von optischer Aktivität.)

Gerade mehrere von A. Mc Kenzie[2]) ausgeführte asymmetrische Synthesen können zur Beleuchtung dieser Verhältnisse herangezogen werden. Es sind dieses die Bildungen von l-Milchsäure aus dem l-Menthylester und dem l-Bornylester der Brenztraubensäure und die von d-Milchsäure aus dem d-Amylester der Brenztraubensäure, die sich alle bei geeigneter Reduktion vollziehen.

Es kann kaum noch zweifelhaft sein, daß Oxydationen und Reduktionen in lebenden Organismen größtenteils oder ausschließlich als gekoppelte Reaktionen verlaufen. Auf Grund dessen bietet die Vorstellung gar keine Schwierigkeiten, daß der Übergang von aktivem Glycerinaldehyd in aktive Milchsäure etwa folgendermaßen zustande kommt:

$$a)\ \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ HCOH \\ | \\ COH \end{array} + O = \begin{array}{c} CH_2OH \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH, \end{array}$$

[1]) C. Neuberg in Oppenheimers Handb. d. Biochem., Ergänzungsband 1913.

[2]) A. Mc Kenzie, Journ. of Chem. Soc. 87, 1373, 1905; 89, 688, 1906. — A. Mc Kenzie und H. A. Müller, ebenda 95, 544, 1909.

β) $\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH \end{array} = H_2O + \begin{array}{l} CH_2 \\ \| \\ COH \\ | \\ COOH, \end{array}$

γ) $\begin{array}{l} CH_2 \\ \| \\ COH \\ | \\ COOH \end{array} \rightleftarrows \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH, \end{array}$

δ) $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{array}$ + akt. Glycerinaldehyd = $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \diagup OH \\ C \\ | \diagdown Glycerinyl \\ COOH \end{array}$ [1]),

ε) $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \diagup OH \\ C \\ | \diagdown Glycerinyl \\ COOH \end{array} + H_2 = \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH \end{array}$ + akt. Glycerinaldehyd.

aktive Milchsäure

oder

ζ) $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COOH \end{array}$ + akt. Glycerinaldehyd = H_2O + $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COO.Glycerinyl, \end{array}$

η) $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CO \\ | \\ COO.Glycerinyl \end{array} + H_2 = \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ HCOH \\ | \\ COO.Glycerinyl, \end{array}$

ϑ) $\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ HCOH \\ | \\ COO.Glycerinyl \end{array} + H_2O = \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOH \end{array}$ + akt. Glycerinaldehyd.

aktive Milchsäure

Mit anderen Worten, es entsteht aus einem Molekül aktiven Glycerinaldehyds in eindeutiger Weise ein Molekül strukturell inaktiver Brenztraubensäure (α bis γ). An diese lagert sich ein unverändertes Molekül aktiven Glycerinaldehyds an zu einem Glycerinylacetal (δ) oder zu einem Glycerinylester (ζ),

---

[1]) Unter Glycerinyl wird hier der Rest $-O.CH_2.\overset{*}{C}HOH.CHO$ verstanden.

und indem Reaktion α und ε, bzw. α und η „gekoppelt" verlaufen, geht aus aktivem Glycerinaldehyd aktive Milchsäure in chemisch verständlicher Weise hervor.

Statt der Reaktionsfolge über Brenztraubensäure kann man ganz analog den Weg vom aktiven Glycerinaldehyd über das Methylglyoxal und dessen asymmetrische Hydration über ein aktives Alkoholat oder einen aktiven Aldehydammoniak- bzw. Ketonammoniakkörper u. dgl. formulieren (s. oben).

Dabei braucht nicht hervorgehoben zu werden, daß die intermediäre Acetal-, Halbacetal- oder Esterbildung durch Amid-, Komplex- oder analoge Bindungen ersetzt werden kann und daß solche Reaktionen außer mit dem Ausgangsmaterial mit den zahlreich zur Verfügung stehenden optisch-aktiven Zellbestandteilen zustande kommen können.

So überaus wertvoll die experimentellen Feststellungen von Embden und seinen Mitarbeitern sind, den theoretischen Deduktionen wird man vorläufig schwerlich folgen können. Denn bevor keine Reaktion bekannt geworden ist, bei der das mittlere Kohlenstoffatom des aktiven Glycerinaldehyds bei dem Übergang in aktive Milchsäure (bzw. umgekehrt) nachweislich dauernd seine asymmetrische Struktur bewahrt, kann die Formulierung von Embden und seinen Mitarbeitern nicht akzeptiert werden. Damit entfällt bereits die Begründung ihrer Behauptung, daß in der belebten Natur ganz allgemein der aktive Glycerinaldehyd die Muttersubstanz der d-Milchsäure, das Dioxyaceton die Quelle der racemischen Milchsäure sei. Bei dem leichten wechselseitigen Übergang der beiden Triosen ineinander, den das gemeinsame Enol $CH_2OH.C(OH):CHOH$ vermitteln dürfte, ist eine solche prinzipielle Trennung gar nicht wahrscheinlich.

Es liegen auch Versuche vor, die im Widerspruch stehen mit jenen Annahmen Embdens und seiner Mitarbeiter über die direkten konfigurativen Beziehungen.

So spricht ein von S. Oppenheimer[1]) mitgeteilter Versuch gerade im entgegengesetzten Sinne. Die Depolymerisation der d-Glucose führt zu 2 Mol. aktiven Glycerinaldehyd, die von d-Fructose zu 1 Mol. aktiven Glycerinaldehyd und 1 Mol. Dioxyaceton. Wenn also die erwähnten einfachen Vorstellungen

[1]) S. Oppenheimer, diese Zeitschr. 45, 44, 1912.

über die Entstehung der Milchsäuremodifikationen richtig wären, sollte man aus Fruchtzucker weniger d-Milchsäure als aus d-Glucose erwarten. Der Versuch an der Hundeleber ergab das Gegenteil!

Mandel und Lusk[1]) fanden d,l-Milchsäure zu mehr als 70 $^0/_0$ befähigt, beim Phlorizintier d-Glucose zu bilden. Wenn der Weg wirklich direkt über den Glycerinaldehyd führen würde, so müßte nach Embden aus l-Milchsäure doch l-Glycerinaldehyd hervorgehen, dessen Polymerisation zu d-Glucose unmöglich ist. Das nahe verwandte d,l-Alanin liefert nach Lusk[2]) quantitativ Traubenzucker. Solche Übergänge scheinen nur möglich, wenn ein symmetrisches Zwischenprodukt auftritt und dann asymmetrisch umgebaut wird. Die Gleichwertigkeit von d- und l-Milchsäure sowie von d- und l-Alanin als Zuckerbildner würden in einer intermediären Entstehung von Brenztraubensäure oder Methylglyoxal eine Erklärung finden. Glycerin kann allem Anschein nach fast quantitativ zu d-Glucose werden, da es strukturell inaktiv ist und wohl vollkommen asymmetrisch im Tierkörper oxydiert werden kann.

Freilich lassen sich gegen die Beweiskraft der Phlorizinversuche Bedenken geltend machen [M. Cremer[3]), P. Mayer[4])].

Das relativ oft beobachtete Auftreten von d,l-Milchsäure kann auf die leichte Hydratisierbarkeit des gewöhnlichen Methylglyoxals zurückgeführt werden. Bezüglich der Entstehung der aktiven Milchsäuren gelangt man zu neuartigen Vorstellungen durch folgende Überlegungen:

Für das Methylglyoxal wird in der Regel die Formel $CH_3.CO.COH$, allenfalls die Formel $CH_2:C(OH).COH$ in Betracht gezogen. Das mag als einfachster Ausdruck der Zusammensetzung berechtigt sein. Man muß jedoch beachten, daß eine derartige Verbindung zur Bildung von Hydraten besonders geneigt ist. Solche Hydrate sind für das Methylglyoxal bekannt und in wässeriger Lösung unzweifelhaft vorhanden.

---

[1]) A. R. Mandel und G. Lusk, Amer. Journ. of Physiol. 16, 129, 1906.

[2]) G. Lusk, Arch. of Internat. Med. 1909.

[3]) M. Cremer, Verhdl. d. Berl. Physiol. Ges. 1912, 97.

[4]) P. Mayer, diese Zeitschr. 49, 486, 1913.

Mindestens 8 verschiedene monomolekulare Formen des Methylglyoxals sind denkbar:

1. $CH_3.CO.CHO$
2. $CH_3.CO.CH(OH)_2$
3. $CH_3.C(OH)_2.CHO$
4. $CH_3.C(OH)_2.CH(OH)_2$
5. $CH_2:C(OH).CHO$
6. $CH_2:C(OH).CH(OH)_2$
7. $CH_3.\overset{*}{C}(OH).\overset{*}{C}H(OH)$ (Brücke über O)
8. $CH_2:C\,.\,\overset{*}{C}H(OH)$ (Brücke über O)

Besonders bemerkenswert ist, daß eine von ihnen 2 asymmetrische Kohlenstoffatome, eine andere eines enthält, daß also beide in optisch-aktiven Formen auftreten können. Man darf sogar annehmen, daß bei einem Nichtelektrolyten wie Methylglyoxal die verschiedenen Tautomeren und Hydrate eine gewisse Beständigkeit in wässeriger Lösung aufweisen.

Hierzu kommt, daß Methylglyoxal stark zu Polymerisationen neigt. Harries und Türck[1]) beobachteten eine 4fach-molekulare Form, $(C_3H_4O_2)_4$, Meisenheimer[2]) eine trimolekulare, $(C_3H_4O_2)_3$. Die Zahl der polymolekularen Gebilde symmetrischer und asymmetrischer Struktur ist bereits sehr groß! Man kann also sagen, daß kaum eine biologische wichtige Substanz in so viel verschiedenen Formen auftreten kann wie Methylglyoxal.

In diesen wechselvollen Zustandsmöglichkeiten kann vielleicht der Schlüssel für die Rolle und das Verhalten des Methylglyoxals im intermediären Stoffwechsel gesucht werden.

Denn es ist klar, daß im normalen Umsatz gebildetes Methylglyoxal einen anderen Bau haben kann als das zugesetzte synthetische Produkt. Während das künstliche Material auf alle Fälle optisch-inaktiv ist, kann für das aus Traubenzucker [im Sinne der bekannten Formulierung von Wohl[3])] hervorgehende Methylglyoxal folgendermaßen eine optisch-aktive Modifikation, bzw. deren mehrere, abgeleitet werden:

---

[1]) C. Harries und H. Türck, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 38, 1630, 1905.

[2]) J. Meisenheimer, ebenda 45, 2640, 1912.

[3]) A. Wohl, diese Zeitschr. 5, 56, 1907.

$$\begin{array}{c} CH.(OH)_2 \\ | \\ HCOH \\ | \\ OHCH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ CH_2OH \end{array} \qquad \begin{array}{l} \overset{*}{C}HOH \\ |\!>O \\ C \\ \| \\ CH \\ | \\ H\overset{*}{C}OH \\ | \\ COH \\ \| \\ CH_2 \end{array} \qquad \begin{array}{l} \overset{*}{C}HOH \\ |\!>O \\ C \\ \| \\ CH \\ | \\ H\overset{*}{C} \\ |\!>O \\ \overset{*}{C}OH \\ | \\ CH_3 \end{array} \quad \text{bzw. das Anhydrid} \quad \begin{array}{l} \overset{*}{C}HOH \\ |\!>O \\ C \\ \| \\ CH \\ | \\ H\overset{*}{C} \\ |\!>O \\ C \\ \| \\ CH_2 \end{array}$$

Durch einfache Abspaltungen und Verschiebungen von H—OH gelangt man zunächst zu obigen Formeln von Methylglyoxalaldol bzw. dessen Anhydrid. Die Lösung der Aldolbindung bzw. Hydrolyse führt zu aktiven Formen des Methylglyoxals, die asymmetrisch sind und ein Drehungsvermögen in letzter Linie von dem Ausgangsmaterial, dem Traubenzucker, beziehen können.

Damit scheint es verständlich, wieso aus Traubenzucker im normalen Stoffwechsel d-Milchsäure wird, obgleich die Reaktion über Methylglyoxal führen kann. Dadurch wird weiter begreiflich, warum aus synthetischem Methylglyoxal (und aus synthetischem Glycerinaldehyd) l-Milchsäure im biologischen Experiment hervorgehen kann. Bei beiden Kategorien ist der Reaktionsmechanismus aber total verschieden. Dem im Abbau gebildeten Methylglyoxal induziert der Traubenzucker eine andere Struktur und optische Aktivität, als sie durch Umbau verändertes Methylglyoxal annimmt.

Ja man kann sogar ableiten, daß in den Embdenschen Experimenten aus racem. Glycerinaldehyd die entgegengesetzte Form der Milchsäure hervorgehen wird, wie aus Traubenzucker. Man braucht nur anzunehmen, daß die „natürliche“ Komponente in andrer Weise oder mit anderer Geschwindigkeit verbraucht wird als der Antipode. Letzterer könnte dann im Sinne folgender Formulierungen in l-Milchsäure übergehen:

$$\overset{\text{I.}}{\begin{array}{l} CHO \\ | \\ {}^{*}CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}} \xrightarrow{+H_2O} \overset{\text{II.}}{\begin{array}{l} CH(OH)_2 \\ | \\ {}^{*}CHOH \\ | \\ CH_2OH \end{array}} \xrightarrow{-H_2O} \overset{\text{III.}}{\begin{array}{l} {}^{*}CHOH\diagdown \\ | \qquad\quad >O \\ {}^{*}CH\;\diagup \\ | \\ CH_2OH \end{array}} \xrightarrow{\begin{array}{c} -OH \\ | \\ H \end{array}} \overset{\text{IV.}}{\begin{array}{l} {}^{*}CHOH\diagdown \\ | \qquad\quad >O \\ C\;\diagup \\ \| \\ CH_2 \end{array}}$$

V. *CHOH / *COH / CH₃ >O + OH/H → VI. C(OH)₂ / *CHOH / CH₃ + OH/H → VII. — H_2O → COOH / *CHOH / CH_3

$$\text{V.}\ \begin{matrix} ^{*}CHOH \\ | \\ ^{*}COH \\ | \\ CH_3 \end{matrix} \!\!> O \;+\; \begin{matrix} OH \\ | \\ H \end{matrix} \longrightarrow \text{VI.}\ \begin{matrix} C(OH)_2 \\ | \\ ^{*}CHOH \\ | \\ CH_3 \end{matrix} \;+\; \begin{matrix} OH \\ | \\ H \end{matrix} \longrightarrow \text{VII.}\ -H_2O \longrightarrow \begin{matrix} COOH \\ | \\ ^{*}CHOH \\ | \\ CH_3 \end{matrix}$$

Dabei verliert zwar das typische C-Atom des Glycerinaldehyds seine Asymmetrie (Phase IV), und vorübergehend wird ein anderes Kohlenstoffatom Träger der Aktivität. Diese ist aber vom Ausgangsmaterial empfangen und kann bei allen folgenden H — OH-Verschiebungen (Phase V bis VII) als richtender Einfluß weiter wirken.

Die Formulierung auf S. 494, die keine asymmetrische Zwischenstufe enthält, würde erklären, wieso aus Dioxyaceton vorwiegend d, l-Milchsäure entsteht. Weil Dioxyaceton nicht asymmetrisch verbraucht werden kann, ist keine Gelegenheit zur Bildung von Methylglyoxalformen gegeben, die zu aktiven Modifikationen der Milchsäure hinleiten.

Stellt man sich vor, daß fertig verwendetes (synthetisches) Methylglyoxal vorübergehend an irgendein optisch-aktives Material gebunden und dabei tautomerisiert wird, so ist es klar, daß nach Lösung dieser Kuppelung eine Modifikation des Methylglyoxals frei werden kann, die sterische Beziehungen zur l-Milchsäure besitzt.

Diese Betrachtungen möchte ich mit folgenden zwei Hinweisen schließen:

a) Die Existenz aktiver Modifikationen scheinbar strukturell symmetrischer Formen ist keine bloße theoretische Forderung, sondern sie ergibt sich aus einer wichtigen Arbeit von W. Marckwald und L. Karczag[1]).

Marckwald und Karczag stellten den Monomethylester der Mesoweinsäure

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ COOCH_3 \end{matrix}$$

in optisch-aktiven Formen dar. Der Methylrest kann im Prinzip durch jede andere Bindungsform, z. B. auch durch das Anhydrid

$$\begin{matrix} COOH \\ | \\ HCOH \\ | \\ HC \\ | \\ CO \end{matrix} \!\!> O$$

[1]) W. Marckwald und L. Karczag, Ber. 42, 1518, 1909.

ersetzt sein. Letzteres, das etwa den drehenden Methylglyoxalformen entsprechen würde, dürfte im speziellen Fall der i-Weinsäure aus bestimmten Gründen zwar wenig beständig sein.

b) Im Sinne dieser Formulierungen sind nun von vielen symmetrischen Gebilden passagere aktive Modifikationen und Derivate denkbar, so von:

Brenztraubensäure: $CH_3.\overset{*}{C}(OH).CO$, (C und CO durch —O— verbunden)

Glyoxalsäure: $\overset{*}{C}H(OH).CO$, (CH und CO durch —O— verbunden)

Mesoxalsäure: $COOH.\overset{*}{C}(OH).CO$, (C und CO durch —O— verbunden)

Acetessigsäure: $CH_3.\overset{*}{C}(OH).CH_2.CO$, (C und CO durch —O— verbunden)

bzw. $CH_3.\overset{*}{C}\langle^{OR}_{OH}.CH_2.COOH$,

Acetaldehyd: $CH_3.\overset{*}{C}H\langle^{OR}_{OH}$,

Citronensäure:
$$\begin{array}{l} CH_2.C(OH)_2, \\ \quad | \\ COOH.\overset{*}{C}-O \\ \quad |\qquad | \\ CH_2.CO \end{array}$$

Glycerin: $CH_2OH - \overset{*}{C}H - CH_2$, (CH und CH_2 durch O verbunden)

Dioxyaceton: $CH_2OH - \overset{*}{C}(OH) - CH_2$, (C und CH_2 durch —O— verbunden)

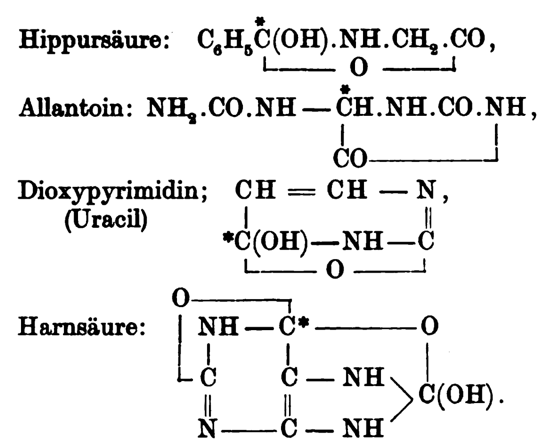
Acetol: $CH_3\overset{*}{C}(OH).CH_2$, (C und CH_2 durch —O— verbunden)

Glycolaldehyd: $CH_2.\overset{*}{C}H(OH)$, (CH_2 und CH durch O verbunden)

Harnstoff: $NH_2.\overset{*}{C}(OH).NH_2$, (C und NH_2 durch O verbunden)

Acetamid: $CH_3.\overset{*}{C}(OH).NH_2$, (C und NH_2 durch O verbunden)

Aminoacetaldehyd: $\overset{*}{C}H(OH).CH_2.NH_2$, (CH und NH_2 durch —O— verbunden)



Wie gering die Beständigkeit dieser bisher nicht beachteten Gebilde (Hydrate, Anhydride, Hydratanhydride, Betainformen, Additionsprodukte usw.) im einzelnen auch sein mag, es ist unzweifelhaft, daß ihre noch so kurze Existenz für den Ablauf biologischen Geschehens von größter Wichtigkeit sein könnte. In diesem Sinne verdient auch der Umstand Beachtung, daß gerade die im tierischen und pflanzlichen Stoffwechsel, für Ab- und Aufbau, bedeutsamsten Verbindungen in diese Gruppe „zeitweilig asymmetrischer Substanzen" gehören würden.

A. Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure durch Muskelextrakte.

a) *α*) 200 ccm wässeriger Muskelauszug, der in der zuvor beschriebenen Weise dargestellt war, wurden mit 1,4 g gefällten Calciumcarbonats versetzt und mit CO_2 gesättigt. Alsdann wurden 0,72 g Methylglyoxal[1]) nebst 4 Tropfen Toluol hinzugefügt und die Mischung unter häufigem Umschütteln 24 Stunden im Brutschrank belassen.

β) Gleichzeitig wurden 200 ccm desselben Muskelextraktes nach Zugabe von 1,4 g $CaCO_3$ und nach Behandlung mit CO_2 ohne Zusatz von Methylglyoxal, aber unter Zugabe von ebenfalls 4 Tropfen Toluol, für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

γ) 200 ccm destilliertes Wasser wurden mit 1,4 g $CaCO_3$ ver-

[1]) 100%iges Präparat, kontrolliert nach Meisenheimer (l. c.) durch Überführung in das Semicarbazon.

setzt und nach Sättigung mit CO_2 sowie nach Zugabe von 0,72 g Methylglyoxal ebenfalls 24 Stunden im Brutschrank digeriert.

Alle 3 Proben wurden alsdann aufgekocht und auf 250 ccm aufgefüllt. 200 ccm wurden abfiltriert, auf dem Wasserbade eingeengt und der besprochenen Alkoholbehandlung unterworfen.

Es wurden in diesen 200 ccm darin gefunden, berechnet aus aliquoten Teilen:

bei α) 0,5103 g $CaSO_4$,
" β) 0,0926 g $CaSO_4$,
" γ) 0,0840 g $CaSO_4$.

0,3337 g $CaSO_4$

stammen aus umgewandeltem Methylglyoxal, entsprechend 0,4416 g Milchsäure. Im ganzen sind $^5/_4 . 0{,}4416 = 0{,}5520$ g Milchsäure gebildet; das sind 61,3 $^0/_0$ der Theorie.

b) Ein zweiter Versuch wurde in genau gleicher Weise, aber mit den doppelten Mengen von Organauszug (400 ccm) und Methylglyoxal (1,44 g), sowie mit Senföl als Antisepticum angesetzt. Im Brutschrank stand diese Probe 20 Stunden.

Dabei wurden folgende Mengen durch Bestimmung aliquoter Teile ermittelt:

α_1) 1,0672 g $CaSO_4$,
β_1) 0,0846 g $CaSO_4$,
γ_1) 0,1720 g $CaSO_4$.

0,8106 g $CaSO_4$

sind aus Methylglyoxal hervorgegangen. Diese Quantität entspricht 1,0728 g Milchsäure oder $^5/_4 . 1{,}0728 = 1{,}3410$ g Milchsäure in toto. 74,5 $^0/_0$ der theoretisch möglichen Menge Milchsäure sind demnach aus Methylglyoxal gebildet worden.

B. Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure durch Leberextrakte.

Zwei ganz entsprechende Versuche wurden mit 200 ccm sowie 400 ccm Leberauszug und 0,72 g bzw. 1,44 g Methylglyoxal sowie mit Toluol als Antisepticum vorgenommen.

Bei Versuch c dauerte die Digestion 19, bei d 23 Stunden.

Die abgeschiedenen Mengen schwefelsauren Kalkes waren in:

c) α) 0,5748 g $CaSO_4$,
β) 0,1039 g $CaSO_4$,
γ) 0,0878 g $CaSO_4$.

0,3831 g $CaSO_4$ (= 0,5070 g Milchsäure)

und in

d) α_1) 1,0773 g $CaSO_4$,
β_1) 0,0883 g $CaSO_4$,
γ_1) 0,1610 g $CaSO_4$.

0,8280 g $CaSO_4$ (= 1,0958 g Milchsäure).

Daraus berechnet sich:

in Versuch c: $^5/_4 \cdot 0{,}5070 = 0{,}6338$ g Milchsäure, entsprechend 70,4 $^0/_0$ der Theorie;

in Versuch d: $^5/_4 \cdot 1{,}0958 = 1{,}3697$ g Milchsäure, entsprechend 76,1 $^0/_0$ der Theorie.

C. Umwandlung von Methylglyoxal in Milchsäure durch obergärige Hefe.

I.

e) 25 g frische Hefe B wurden in 200 ccm Wasser suspendiert, das mit 1,4 g kohlensaurem Kalk versetzt und mit Kohlendioxyd gesättigt war. Dann wurden 0,72 g Methylglyoxal eingefüllt.

Das Gemisch wurde 26 Stunden bei 35° ohne Zugabe eines Antisepticums digeriert und nach kurzem Aufkochen auf ein Volumen von 250 ccm gebracht.

200 ccm des leidlich klaren Filtrats wurden alsdann auf dem Wasserbade eingeengt und der gleichen Alkoholbehandlung unterworfen wie die Gewebsauszüge. Dabei wird die ursprüngliche Trübung mit beseitigt (α).

Als Kontrolle wurde dieselbe Menge Hefe in 200 ccm Calciumbicarbonat enthaltendem Wasser 56 Stunden im Brutschrank digeriert (β), und schließlich wurden wieder 0,72 g Methylglyoxal in 200 ccm Kohlendioxyd und $CaCO_3$ enthaltendem Wasser gleichzeitig bei 37° stehen gelassen (γ).

Auch die Proben β und γ wurden nach 26 Stunden aufgekocht und in der beschriebenen Weise behandelt.

Abgeschieden wurden:

bei α) 0,1933 g $CaSO_4$,
" β) 0,0094 g $CaSO_4$,
" γ) 0,0777 g $CaSO_4$.

0,1062 g $CaSO_4$, entspr. 0,1406 g Milchsäure,

sind auf die Säurebildung aus Methylglyoxal zu beziehen. Die Umwandlung erreichte hier $^5/_4 \cdot 0{,}1406 = 0{,}1757$ g Milchsäure oder 19,5 $^0/_0$ des theoretisch möglichen Umfangs.

II.

f) Der Versuch mit Macerationssaft aus getrockneter obergäriger Hefe XII wurde in der Weise angestellt, daß 400 ccm des frischen, unverdünnten Saftes, der seiner Darstellung nach ja mit CO_2 gesättigt ist, mit 2,8 g kohlensaurem Kalk, sowie mit 1,44 g Methylglyoxal nebst 8 Tropfen Toluol versetzt wurden. Das Gemisch (α) und die Kontrollen [100 ccm Saft mit 0,7 g $CaCO_3$ und 2 Tropfen Toluol (β); Kontrolle für Methylglyoxal allein identisch mit γ des Versuches e] wurden 56 Stunden bei 35° unter öfterem Umschütteln belassen.

Nach Ablauf dieser Zeit, in der sich die methylglyoxalhaltige Probe deutlich dunkler als der Saft allein gefärbt hatte, wurden α und β aufs Doppelte mit Wasser verdünnt und im siedenden Wasserbade zur Gerinnung gebracht. Das abfiltrierte Koagulum wurde noch 2 mal mit je 800 bzw. 200 ccm Wasser ausgekocht. Die vereinigten wasserklaren Filtrate wurden in gewohnter Weise verarbeitet. Dabei wurden gefunden, ermittelt an aliquoten Teilen,

für α: insgesamt 0,7287 g $CaSO_4$,
" β: (unter Umrechnung aufs 4 fache Volumen) 0,0117 g $CaSO_4$,
" γ: (unter Umrechnung auf die doppelte Quantität und unter Berücksichtigung der Volumenverhältnisse) . . . . . . 0,1943 g $CaSO_4$,

0,5227 g $CaSO_4$ sind hier insgesamt aus Methylglyoxal hervorgegangen. Sie entsprachen 0,6918 g Milchsäure, d. i. 38,4% der Theorie.

D. Die optischen Verhältnisse der aus Methylglyoxal gebildeten Milchsäure.

Wie zuvor erwähnt gelingt es, die alkoholischen Auszüge des entstandenen Calciumlactats so farblos zu erhalten, daß die wässerige Lösung des Rückstands zur direkten Polarisation geeignet ist.

Der in 10 ccm Wasser aufgenommene Rückstand der Kontrollproben wies im 2-dcm-Rohr stets eine Linksdrehung[1]) auf. Sie schwankte bei den reinen Muskelextrakten zwischen

[1]) Diese Linksdrehung dürfte auf Eiweißspaltprodukte und wohl auch auf wenig β-Oxybuttersäure sowie d-milchsaures Salz zu beziehen sein.

0,12° und 0,22°; bei den Leberauszügen war die Linksdrehung etwas größer, bis — 0,28°.

Die aus frischen Hefen erhaltenen Auszüge zeigten keine sicher erkennbare Drehung, während der Auszug aus Macerationssaft nicht unbeträchtlich nach links dreht (im 2-dcm-Rohr — 0,65°).

Nun sind die wässerigen Lösungen von d-Calciumlactat lävogyr, die von l-Calciumlactat dextrogyr. Es ist also klar, daß die Rechtsdrehung in den Methylglyoxalversuchen die Entstehung von l-Lactat anzeigt. Nun ist aber die Drehung des milchsauren Calciums gerade relativ gering und hinzu kommt, daß ja in den Gewebsauszügen selbst etwas d-Milchsäure vorhanden ist. Darum ist es empfehlenswerter, aus der Lösung des Calciumsalzes das Zinklactat herzustellen, das zudem eine stärkere optische Aktivität besitzt.

Diese Überführung kann man bei den so weitgehend gereinigten Lösungen des Calciumlactats sehr bequem nach dem von Langstein und Neuberg[1]) angewandten Verfahren bewerkstelligen. Man läßt die auf etwa 5 ccm eingeengte Flüssigkeit von einem Gemisch aus 30 g entwässertem Natriumsulfat und 3 g Kaliumbisulfat aufsaugen und extrahiert die Masse mit Äther. Der beim Verdampfen des Äthers hinterbleibende Rückstand wird in Wasser gelöst und in üblicher Weise in das Zinksalz übergeführt. Dasselbe krystallisiert ohne Schwierigkeit. Von einer fraktionierten Krystrallisation ist absichtlich Abstand genommen.

Nach diesem Verfahren sind die Zinksalze in den Versuchen b), d) und f) dargestellt.

Hierfür waren verfügbar[2]):

bei b) $^{3}/_{4}$ des Alkoholauszugs,
„ d) $^{8}/_{9}$ „ „ ,
„ f) $^{2}/_{3}$ „ „ .

Gewonnen wurden aus diesen Mengen:

1,16 g Zinksalz b,
1,34 g „ d und
0,71 g „ f.

---

[1]) L. Langstein u. C. Neuberg, Ber. d. Verhandl. d. Berl. Physiol. Ges. 1902/1903, 114. — C. Neuberg, „Der Harn", S. 249.

[2]) nach Ausführung der Kalkbestimmungen in einem aliquoten Teile.

Von diesen zeigte:

Zinksalz b die spez. Drehung $[\alpha]_D^{22°} = +7{,}47°$,
" d " " " $[\alpha]_D^{17°} = +9{,}38°$,
" f " " " $[\alpha]_D^{18°} = 0°$.

Die Drehungsverhältnisse lassen erkennen, daß bei b und d nahezu reines l-milchsaures Zink vorliegt, dagegen bei f das Salz der Racemverbindung.

Zur Kontrolle dieses Ergebnisses wurden Bestimmungen des Krystallwassergehaltes vorgenommen, der beim aktiven Salz 12,86 % (2 mol H_2O) und beim inaktiven 18,18 % (3 mol H_2O) beträgt.

Gefunden wurde:

für b 13,15 % H_2O,
" d 13,22 % " ,
" f 18,59 % " .

Diese Ermittlungen bestätigen völlig die polarimetrischen Feststellungen.

Zu einer klaren Übersicht der Verhältnisse gelangt man, wenn man diese aus den aliquoten Flüssigkeitsmengen isolierten Quantitäten Zinksalz auf die richtigen Volumina umrechnet. Unter Berücksichtigung der zuvor gemachten Angaben findet man für:

b) $(1{,}16 + {}^1/_4 \cdot 1{,}16) \cdot {}^5/_4 = 1{,}81$ g l-Zinklactat,
d) $(1{,}34 + {}^1/_9 \cdot 1{,}34) \cdot {}^5/_4 = 1{,}86$ g l-Zinklactat,
f) $0{,}71 \cdot {}^5/_4 = 0{,}89$ g d, l-Zinklactat.

In allen drei Fällen sind 1,44 g Methylglyoxal angewandt worden. Bei quantitativem Umsatz zur aktiven Form könnten daraus 2,79 g Zinksalz entstehen. In den in Betracht kommenden Fällen *b* und *d* hat somit unzweifelhaft ein asymmetrischer Umbau stattgefunden.

Derartige quantitative Kontrollen der Bildung aktiver Substanzen werden unsere Kenntnisse vom asymmetrischen Verlauf solcher biologischen Reaktionen erweitern.

Autorenverzeichnis.

